

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

E.A.P DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**Diseño de una formulación de aplicación tópica a base
de Baccharis latifolia (Chilca), con efecto
antiinflamatorio**

TESIS

para optar el título profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Kelly Melissa Hoyos Vargas

Man Yien Yep Chu

ASESOR

Armando Rivero Laverde

Lima – Perú

2008

A los catedráticos de la facultad de Farmacia y Bioquímica por los valiosos conocimientos brindados.

A las cátedras de Farmacognosia, Química Orgánica, Farmacología y Farmacotecnia por las facilidades brindadas en la ejecución de este trabajo de tesis.

A los distinguidos miembros del jurado calificador por las invalorables observaciones realizadas en la revisión de este trabajo.

A mi papá Honorio, mi mamá Alicia y mi hermana Cindy por su apoyo incondicional durante la elaboración de este trabajo de investigación.

A mi abuelo Tomás y mi tía Mercedes por su apoyo en la obtención del material de investigación empleado en este trabajo.

A ManYien por su apoyo y colaboración en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Bach. Kelly Melissa Hoyos Vargas

A mis padres y mis hermanas por su cariño y constante apoyo a lo largo de mi vida.

A mis amigos, que de muchas formas me ayudaron a alcanzar esta meta.

A Melissa por el trabajo en conjunto, su esfuerzo y dedicación a lo largo del proyecto.

Bach. ManYien Yep Chu

ÍNDICE

Resumen

Abstract

I. Introducción

II. Generalidades

2.1 *Baccharis latifolia*

2.2 Inflamación

2.3 Fitoquímica

2.4 Aspectos tecnológicos

III. Parte experimental

3.1 Materiales, equipos y reactivos

3.2 Metodología

IV. Resultados

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Recomendaciones

VIII. Referencias Bibliográficas

IX. Anexos

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en dos etapas principales: la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de la especie *Baccharis latifolia* “Chilco”; y, la obtención, caracterización y evaluación de la actividad antiinflamatoria de una forma farmacéutica de aplicación tópica conteniendo el extracto en estudio. En la obtención del extracto hidroalcohólico se emplearon hojas secas y pulverizadas de la planta recolectada en el departamento de Amazonas; este extracto fue caracterizado empleando técnicas fisicoquímicas y cromatográficas y un screening fitoquímico; se evaluó el efecto antiinflamatorio utilizando el método del edema plantar inducido por carragenina en ratones, empleándose concentraciones de 1,25 mg/g, 2,5 mg/g, 3,75 mg/g, 5 mg/g y 7 mg/g del extracto frente a un grupo control; se determinó que la menor concentración que mantiene una inhibición de la inflamación mayor al 70% después de 5 horas de la inyección de carragenina es la concentración de 2,5 mg/g. Esta concentración fue elegida para desarrollar la forma farmacéutica que permitiera la incorporación del extracto al 2% respecto al residuo seco, obteniéndose con la forma farmacéutica crema – gel características óptimas en el producto terminado, el mismo que fue evaluado fisicoquímica y cromatográficamente. Finalmente, se evaluó el efecto antiinflamatorio del producto terminado mediante el método del edema plantar inducido por carragenina en ratones, determinándose que el efecto antiinflamatorio es mayor al del extracto, comprobando que el efecto antiinflamatorio del extracto en crema-gel se mantiene y es incluso superior.

Palabras clave: *Baccharis latifolia*, efecto antiinflamatorio, crema – gel

ABSTRACT

The present work was developed in two main stages: the obtaining, characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of the species *Baccharis latifolia* “Chilco”; and, the obtaining, characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity of a pharmaceutical dosage form of topical usage containing the extract in study satisfactorily. In the obtaining of the hydroalcoholic extract, dry and pulverized leaves of the plant collected in the department of Amazonas were used; this extract was characterized using physicochemical and chromatographic techniques and a phytochemical screening; the anti-inflammatory effect was evaluated using the carragenina-induced edema method in mice, concentrations of 1,25 mg/g, 2,5 mg/g, 3,75 mg/g, 5 mg/g and 7 mg/g of the extract were tested with respect to a control group, it was found that the minor dose which maintains an inhibition of the edema up to the 70% after 5 hours of the carrageenin injection was the 2,5 mg/g concentration. This concentration was chosen to develop the pharmaceutical dosage form that allowed the incorporation of the extract at 2% in relation to the dry residue, obtaining with the pharmaceutical dosage form cream – gel optimal characteristics in the finished product, which was evaluated using physicochemical and chromatographic techniques. Finally, the anti-inflammatory effect of the finished product was evaluated using the carragenina-induced edema method in mice, determining that the anti-inflammatory effect was greater than the effect of the extract, verifying that the anti-inflammatory effect of the extract in the cream-gel stays and is even superior.

Key words: *Baccharis latifolia*, anti-inflammatory effect, cream - gel

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son una alternativa en el tratamiento de enfermedades para numerosos pueblos de nuestro territorio, siendo el conocimiento de las propiedades medicinales de dichas plantas parte del patrimonio cultural de estos mismos. Este conocimiento que ha sido transmitido de generación en generación y que se ha ido formando de la observación y experimentación continua, llega finalmente a nosotros a través de recopilaciones por parte de estudiosos o mediante la tradición oral.

A pesar que este conocimiento había sido relegado desde mediados del siglo XX en favor del uso de medicamentos de origen sintético, en años recientes se ha incrementado el interés por el uso de medicamentos provenientes de plantas medicinales, de ahí la importancia de rescatar el importante legado de nuestros antepasados e incorporarlo en la elaboración de medicamentos que puedan ser utilizados con mayor difusión.

Por eso es importante la contribución en el incremento del conocimiento sobre formulaciones que incorporen activos (sustancias, extractos, etc.) provenientes de plantas medicinales, así como los procesos y procedimientos de pre-tratamiento a emplear en el tratamiento de este material natural.

Por otro lado, también es trascendental el poder proporcionar un valor agregado a las plantas utilizadas como herramientas en la medicina tradicional, al obtener fórmulas efectivas y económicas que puedan ser comercializadas a nivel nacional e internacional, y que a su vez constituyan una alternativa de ingreso económico para la comunidad.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo General:

- Diseñar una forma farmacéutica de aplicación tópica empleando como activo el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Baccharis latifolia*, que mantenga el efecto antiinflamatorio del extracto original.

1.1.2 Objetivos específicos:

- Determinar el perfil cromatográfico de *Baccharis latifolia*.
- Determinar la dosis efectiva media en el extracto de *Baccharis latifolia*.
- Diseñar una formulación que permita la incorporación satisfactoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Baccharis latifolia*.
- Determinar la conservación de la actividad sobre la inflamación aguda del extracto en relación a la formulación diseñada.

1.1.3 Hipótesis:

- La forma farmacéutica de aplicación tópica elaborada empleando como activo el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Baccharis latifolia* mantiene el efecto antiinflamatorio del extracto original.

II. GENERALIDADES

2.1. *Baccharis latifolia*

2.1.1 Clasificación taxonómica

Según el resultado brindado por la jefatura del Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural (Anexo), a la muestra estudiada le corresponde la siguiente posición taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Baccharis*

Especie: *Baccharis latifolia* (R&P) Persoon

Sinónimos:

Molina latifolia R. & P, *Baccharis floribunda* HBK, *Baccharis polyantha* HBK, *Baccharis riparia* HBK, *Plunchea glabra* Grisebach

Nombre vulgar. "Chilco", "Chilca", "Jurac-Chilca", "Taya", "Cchilca", "Chilca negra", "Chilca blanca", "Tola", "Mayu chchilca", "Hayaq ch'illka" (chilca picante), "Chchilka", "Sachahuaca"

(1), (2), (3), (4), (5), (6)

2.1.2 Características de Familia y género

Las especies de este género ostentan una elevada capacidad de propagación natural, por semilla.

Una vez establecidas en el terreno, suelen proliferar de modo espontáneo. (2)

2.1.2.1 Familia asterácea

Esta familia botánica es cuantitativamente la más importante y grande del reino vegetal, además de ser la más evolucionada desde el punto de vista floral, se le considera como la más perfecta debido a los caracteres morfológicos que muestran sus flores. Se calcula en más de 20 000 el número de sus especies, sin considerar las subespecies, variedades, formas y razas. Se encuentra repartida en todas las regiones templadas y frías del mundo, siendo los lugares tropicales los de menor incidencia y densidad. En su mayoría son herbáceas pero puede encontrarse formas arbustivas y muy raras especies arbóreas, se adaptan regularmente a lugares muy áridos y muy húmedos. (7)

2.1.2.2 Género Baccharis

El género *Baccharis* es exclusivamente americano, con gran predominio en las zonas tropicales, está conformado por plantas dioicas. Las flores femeninas poseen una corola filiforme y ápice denticulado o, a veces, cortamente ligulada; presenta un estilo exserto con ramas lineares. Las flores masculinas poseen una corola tubulosa, limbo ensanchado y pentasecto. Las especies pueden ser arbustos, sufrútices o hierbas perennes, a veces presentan xilopodio, raíces gemíferas o rizomas. Las hojas son generalmente alternas, muy pocas veces semiopuestas u opuestas; en algunos casos prontamente caducas o bracteiformes. Los capítulos son pequeños y ordenados en inflorescencias compuestas o pseudoinflorescencias, frecuentemente de tipo mimoso, pueden presentar flores blancas, cremosas o rosadas. (8)

Las especies de este género han sido ampliamente estudiadas debido a su reputada utilización en la medicina tradicional de América Latina. En la fitoquímica de este género se destaca la presencia de flavonoides, diterpenos y triterpenos, siendo claramente reseñada la mayor concentración de flavonas, flavonoles y de diterpenos labdanos y clerodanos. Los flavonoides son descritos como buenos marcadores quimiotaxonómicos en los niveles jerárquicos más bajos de la

familia Asterácea y en este género se presentan generalmente como agliconas libres y muy raramente en la forma glicosilada, que viene ser una característica de la familia Asterácea. De esta manera se ha considerado la presencia de flavonoides aglicónicos como una característica marcada en este género, donde se observa un predominio de flavonas, de las cuales cerca del 50% son C-3 oxigenadas. Asimismo, los diterpenos también son compuestos que se han encontrado en mayor cantidad en este género y son representados principalmente por neo y ent – clerodanos y, menos común, ent – labdanos y kauranos. (9)

2.1.3 Descripción de la especie.

2.1.3.1 Descripción botánica.

Es un arbusto perenne muy ramificado con tallos leñosos de 2 a 3m de altura (Foto 1), las hojas son alternas, dentadas, pecioladas, oblongo-lanceoladas, de ápice acuminado, base decidua o atenuada, de 6 a 12cm de largo y 2 a 3,5cm de ancho, glabras, de color verde-brillante por el haz, pegajosas y con tres nervios pronunciados que salen desde la base, con un pecíolo de 1,5 a 2cm de largo (Foto 2). La inflorescencia es blanquecina paniculada, terminal y ramificada, siendo los ejes principal y secundarios de la inflorescencia glabros; las brácteas externas son oblongas y redondeadas en el ápice, las internas son oblongo-lanceoladas y el receptáculo es convexo (Foto 3). Los frutos son aquenios de 4 a 5mm de longitud, con papo o vilano en las flores femeninas de color pajizo que está formado por aristas largas y abundantes. Su propagación es por semilla y se recoge cuando el vilano está bien desarrollado y los frutos se desprenden fácilmente de los capítulos. (1), (2), (3), (4), (5), (10), (11), (12)



Foto 1. Planta adulta de *Baccharis latifolia*



Foto 2. Hojas de *Baccharis latifolia*



Foto 3. Inflorescencias de *Baccharis latifolia*

2.1.3.2 Distribución

La especie se distribuye por toda la zona tropoandina, de Venezuela a Bolivia y norte de Argentina. Tiene una amplia distribución en la Sierra del Perú, con particular abundancia en la Sierra central (valle del Mantaro en Junín y Callejón de Huaylas en Ancash).

- Rango altitudinal: Entre los 1600 y 3800 m.s.n.m pero preponderantemente entre los 2500 - 3000 m.s.n.m (Sierra Central peruana). En la zona tropoandina se encuentra principalmente entre 2000 y 2800 m.s.n.m pudiendo subir hasta los 3400 m.s.n.m y aún más, pero también se ha encontrado en lugares tan bajos como 1500 m.s.n.m y al sur del área, fuera del cinturón tropical, descende hasta una altitud de 500 a 1100 m.s.n.m (provincia de Tucumán).
- Temperatura: Observada en zonas con heladas eventuales y con temperatura media anual entre 7 – 19 °C.
- Requerimientos de suelos y agua: Se trata de una planta muy rústica y con alta tolerancia a suelos pobres y difíciles (Foto 4). Se adapta prácticamente a cualquier textura y tolera muy bien la alta pedregosidad y las carencias estacionales de agua. (2), (10).



Foto 4. Crecimiento de *Baccharis latifolia* en zonas ribereñas.

2.1.4 Usos

2.1.4.1 Medicinal

Baccharis latifolia es una planta que ha gozado de mucha fama como planta medicinal entre los primitivos pueblos de América, habiendo sido considerada inclusive como una planta sagrada por los efectos terapéuticos que se le han atribuido. (10), (13)

Las hojas limpias pueden ser aplicadas directamente sobre las heridas o afecciones de la piel y dan mejor resultado si se las aplica calientes en las áreas reumáticas. Sus hojas soasadas se aplican sobre sitios correspondientes a fracturas óseas, para desinflamar y ayudar a la consolidación. (10), (14)

Asimismo, las hojas aplicadas en forma de cataplasmas se utilizan para calmar los dolores reumáticos y de la cintura. También es usada para las afecciones bronquiales y pulmonares. Las

hojas y flores frescas o secas en decocción son administradas oralmente para calmar la tos y la bronquitis. (1), (10)

Las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencia) de la planta fresca en infusión o decocción a una concentración de 5% es un buen tónico amargo, antidiabético, eupéptico y para afecciones del hígado. Las hojas frescas y los tallos en infusión también son utilizados para el insomnio y para “la diarrea verde” de los niños. (1), (3), (10), (13)

La infusión de la planta también ha sido considerada como una bebida inmejorable contra el asma, dolores menstruales y afecciones uterinas. (13)

El cocimiento de esta planta junto con las hojas de molle y bastante sal, se usan para desecar y enjuagar heridas en las piernas de pacientes con gota; por otra parte las hojas molidas son aplicadas en las heridas frescas para desecarlas y cicatrizarlas. (13)

Las propiedades terapéuticas y modos de aplicación más importantes que se le atribuyen a esta especie están descritas en la tabla 1. (5)

Tabla 1. Propiedades terapéuticas tradicionales más importantes y modo de uso (5)

Mal, Enfermedad	Uso tradicional
Tos	Emplasto de chilco (hervido en agua) Mate de chilco
Reumatismo	Baños de vapor con chilco
Golpes interiores	Mate de chilco Emplasto de chilco
Luxaciones	Emplasto de chilco
Heridas	Tomar mate y poner emplasto de chilco.
Inflamación	Tomar mate y poner emplasto de chilco.

2.1.4.2. Industrial.

Las hojas trituradas de la planta y hervidas se utilizan para teñir de amarillo o verde. La preparación del tinte se realiza de forma artesanal (Figura 1). (2), (3)



Figura 1. Preparación de tintes a partir de *Baccharis latifolia* (2)

2.1.4.3 Agroforestería

La planta es utilizada para la protección y conservación de los suelos, debido a que su sistema radicular ramifica densamente y no es demasiado largo, de modo que no ofrece competencia a los cultivos. Tiene gran facilidad de propagación natural, y su tolerancia al clima crudo y las sequías es elevada. Así, es idónea para la conformación de barreras vivas y la estabilización de taludes; también lo es para la estabilización de acequias, canales de regadío y zonas ribereñas en general; prolifera de manera natural en estas áreas y tolera bien la inundación estacional. También es importante en la recuperación de suelos compactados por el sobrepastoreo. Asimismo, como leña constituye una fuente de abastecimiento de combustible para el poblador rural de la Sierra peruana. Dado que su leño está impregnado de sustancias resinosas, arde con facilidad aun estando fresco, proporcionando buen fuego. (2), (3)

2.2 Inflamación

La inflamación es una de las respuestas fisiopatológicas fundamentales con las que el organismo se defiende frente a agresiones producidas por gran variedad de estímulos (infecciones, lesiones de diversa índole, procesos isquémicos, interacciones antígeno-anticuerpo, etc.) aunque, en ocasiones, su exageración y persistencia no parezca que sirve a tal propósito.

La respuesta inflamatoria puede dividirse, al menos, en tres fases en las que intervienen mecanismos diferentes:

- Fase aguda, cuyos signos distintivos son la vasodilatación local y el aumento de la permeabilidad capilar;
- Fase subaguda, en la que se produce una infiltración leucocitaria y de células fagocíticas (Figura 2),
- Fase crónica, en la cual existen signos de degeneración y fibrosis en los tejidos afectados (Figura 3).

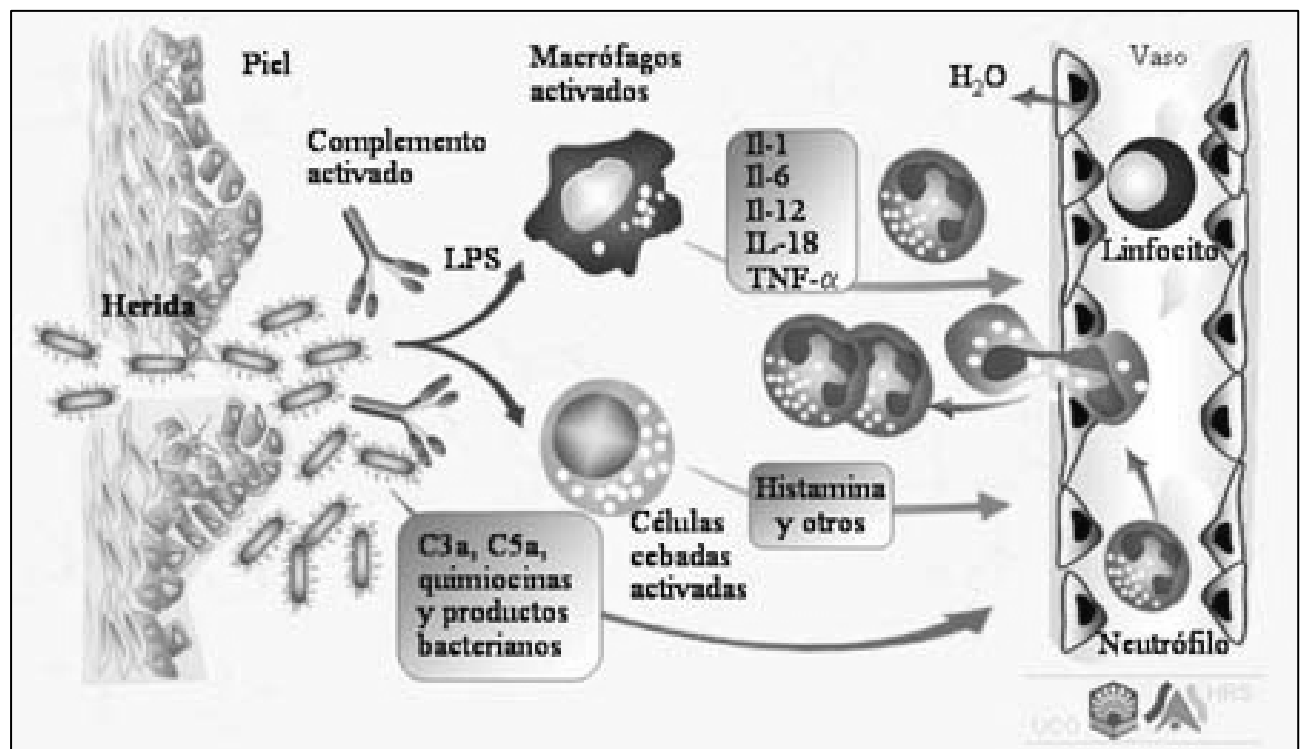


Figura 2. Etapas del proceso inflamatorio: fase aguda y fase subaguda (15)

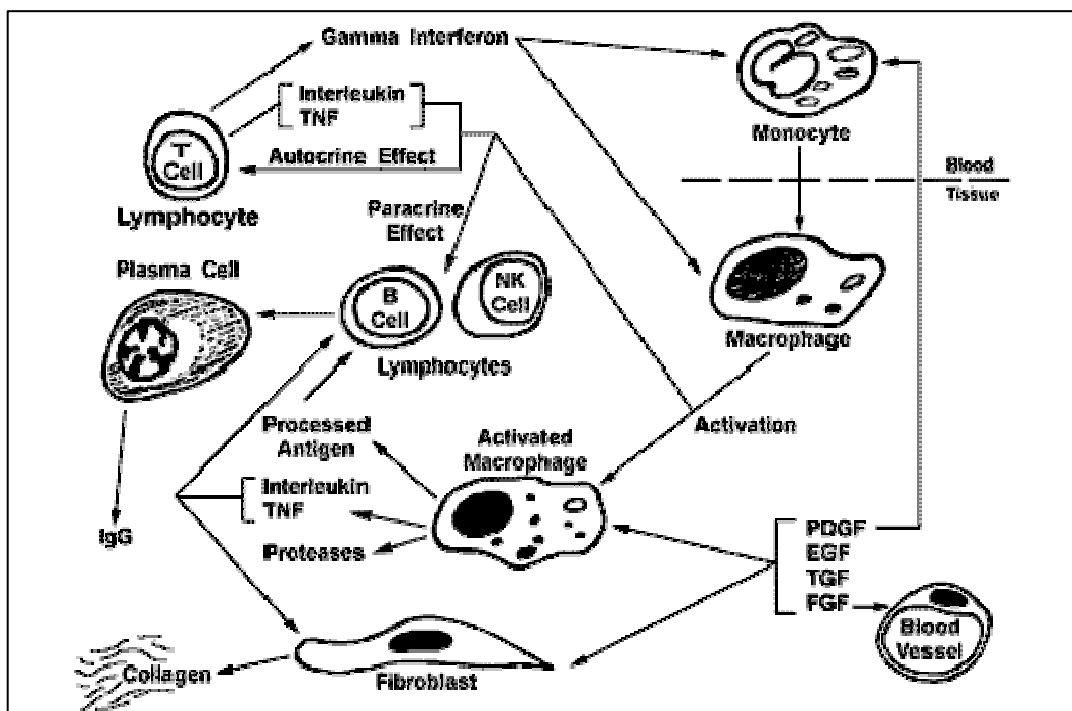


Figura 3. Etapas del proceso inflamatorio: Fase crónica (16)

El número de células tisulares (células endoteliales, mastocitos y macrófagos) y sanguíneas (leucocitos y plaquetas), y de mediadores químicos (factor C5a del complemento, factor activador de crecimiento, histamina y bradicinina) que intervienen en los procesos inflamatorios es muy amplio y variable, siendo asimismo diferente su participación en cada proceso. Aunque en muchas ocasiones la inflamación es autolimitada por el curso temporal del proceso que la desencadenó, en otras ocasiones, especialmente frente a agresiones autoinmunes, la vasodilatación, la quimiotaxis y la liberación de mediadores generan procesos en cascada que facilitan su cronificación. (17)

La iniciación de la respuesta consecutiva a la lesión del tejido tiene lugar en la microvasculatura a nivel del capilar y de la vénula poscapilar. Después de lesionarse un tejido, ocurren alteraciones en la estructura de la pared vascular de modo que se pierde la integridad de las células endoteliales, se filtran líquidos y componentes del plasma desde el compartimento intravascular y se produce emigración de hematíes y leucocitos desde el espacio intraluminal hacia el tejido extravascular. (18)

Los mediadores de la inflamación producidos en los sitios lesionados regulan la respuesta de los vasos a la agresión. Entre estos mediadores figuran moléculas vasoactivas que actúan directamente sobre los vasos aumentando su permeabilidad. Además, se generan factores quimiotácticos que reclutan leucocitos del compartimento vascular y los envían al tejido lesionado, una vez allí los leucocitos reclutados secretan mediadores de la inflamación adicionales, que potencian la respuesta inflamatoria o la inhiben. ⁽¹⁸⁾

Por tanto, se observa que los mediadores de la inflamación provienen de fuentes que se ubican tanto a nivel celular como a nivel plasmático (Tabla 2). Las células involucradas en la liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria son las células cebadas, plaquetas, neutrófilos, macrófagos, basófilos, leucocitos y el propio endotelio vascular. ^{(18), (15)}

Tabla 2. Mediadores químicos de la inflamación: según el sitio de producción ⁽¹⁸⁾

Sitio de producción	Mediadores químicos
Plasma	Por activación del complemento: C3a, C5a, C5b
	Por activación del factor Hagerman (factor XII de la coagulación): estimulación del sistema de cininas, la coagulación y la fibrinólisis.
Célula	Preformados (células cebadas y plaquetas): histamina y serotonina
	Enzimas lisosomales: neutrófilos y macrófagos
	Sintetizados de novo (todos los leucocitos, macrófagos, plaquetas y el endotelio): prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, FAP (factor activador de plaquetas), citocinas y óxido nítrico.

Las plaquetas, que tienen un rol importante en la hemostasia normal y en la iniciación y regulación de la formación del coágulo son fuentes de serotonina, hidroxitriptamina e histamina, mediadores que inducen cambios en la permeabilidad vascular. Producen además tromboxano A₂, que es un metabolito del ácido araquidónico que posee propiedades vasoconstrictoras.

Los mastocitos y basófilos también liberan histamina y serotonina. Además, la estimulación de los mismos conduce a la liberación de productos del ácido araquidónico, incluso las llamadas sustancias de reacción lenta de la anafilaxia (leucotrienos, C₂, D₄ y E₄). Estos productos inducen contracción del músculo liso y aumentan la permeabilidad vascular.

La estimulación de mastocitos y leucocitos genera otra clase de mediadores vasoactivos que se denominan factores de activación plaquetaria que inducen agregación y desgranulación plaquetaria en los sitios de la lesión hística y potencia la liberación de serotonina e histamina implicando cambios en la permeabilidad vascular, ejerce también efectos sobre la microvasculatura y causa vasodilatación, acentuando la permeabilidad vascular en los sitios de la lesión hística. Los macrófagos y las células endoteliales producen citocinas y óxido nítrico, importante vasodilatador. A nivel plasmático se cuenta con las proteínas del complemento (C3a, C5a, C5b). Los mediadores más probables en la inflamación son:

- Vasodilatación: Prostaglandina, óxido nítrico, FAP (Factor activador de plaquetas)
- Vasoconstricción: Leucotrienos, tromboxano A₂
- Aumento de la permeabilidad vascular: Aminoácidos vasoactivos, C3a y C5a, bradicinas, leucotrienos C4, D4 y E4, FAP
- Quimiotaxis, activación leucocitaria: C5a, leucotrieno B4, productos bacterianos, citoninas (IL6)
- Lesión tisular: Enzimas lisosomales de neutrófilos y macrófago, óxido nítrico. (15), (18)

2.2.1 Estudios recientes

El efecto antiinflamatorio de *B. latifolia* ha sido referido en diferentes investigaciones como son los realizados por: Abad M *et al* (2005), donde evaluaron la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de diferente polaridad (extracto hexánico, extracto diclorometánico, extracto etanólico y extracto acuoso) sobre cultivos celulares. En tanto que, Beltran C *et al.* (2006), evaluaron el efecto antiinflamatorio *in vivo* (ratones) de los mismo extractos. Por otro lado, Perez-Garcia F *et al* (2001), evaluaron la actividad de tres extractos de la planta (extracto acuoso, extracto metanólico y extracto diclorometánico) en la producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de oxígeno (ROS), relacionadas al estrés oxidativo. (19), (20), (21).

2.3 Fitoquímica

2.3.1 Antecedentes

Según los estudios realizados por diferentes investigadores, la especie *Baccharis latifolia* presenta como principales compuestos: flavonoides, alcaloides y compuestos triterpénicos y/o esteroídicos. En el estudio realizado por García-Barriga (1975) toda la planta y en especial las hojas contienen resina, oxidasas y dos alcaloides llamados bacarina y trementina. En 1979 Bohlmann *et al* aislaron e identificaron mediante datos químicos y espectrales un compuesto químico con núcleo eudesmano. En 1981 Naranjo, identificó taninos gálicos, quercetina y rutina (flavonoles) y quercitrina. (1), (3), (10)

También ha sido reportada la presencia de un triterpeno (friedelina) y una dimetoxiflavona. (13)

Por otro lado, en el estudio fitoquímico realizado el 2006 por Beltran *et al* a diferentes extractos de las hojas de la *B. latifolia* recolectada en el departamento de Ayacucho (Perú), encontraron taninos, flavonoides, leucoantocianidinas, compuestos fenólicos, quinonas y/o antraquinonas y compuestos esteroídicos y/o triterpenoides. (20)

Así mismo, en otro estudio se identificaron alcoholes saturados lineares, triterpenos, friedelina y flavonas, que parecen ser los compuestos principales. (14)

También Verdi *et al* han recopilado obras donde se han descrito la presencia de 3 compuestos labdanos (diterpeno) y un triterpeno para esta especie. (9)

2.3.2 Flavonoides

Los flavonoides son los pigmentos vegetales más numerosos y se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas, contribuyendo a la coloración de frutos, flores y hojas.

A las especies que contienen flavonoides se les atribuye varias propiedades farmacológicas, como agentes antiinflamatorios, protectores de la pared vascular, vasculoprotectores, venotónicos,

antioxidantes, antiespasmódicos, hepatoprotectores, antihemorrágicos, diuréticos y antiurémicos, antibacteriano o antivirales. (22), (23)

Los flavonoides poseen un amplio espectro de actividad biológica. Desde el punto de vista terapéutico la más importante es su actividad antioxidante, y como resultado tienen una alta tendencia a ceder electrones, asimismo tienen una importante actividad queladora de iones de hierro y son secuestradores directos de especies reactivas de oxígeno. (24)

Desde el punto de vista farmacológico, las plantas con flavonoides muestran actividad antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque no ha sido entendido totalmente, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la actividad antiinflamatoria *in vivo*. Uno de los más importantes mecanismos es la inhibición de enzimas generadoras de eicosanoides como son las enzimas fosfolipasa A₂, ciclooxigenasas y lipoxigenasas, produciendo como consecuencia la reducción de las concentraciones de prostaglandinas y leucotrienos. (25)

Estudios recientes también han mostrado que ciertos flavonoides, en especial los derivados de las flavonas, expresan por lo menos parte de su actividad antiinflamatoria modulando la expresión de genes proinflamatorios como el de la ciclooxigenasa-2, la sintetasa inducible del óxido nítrico, y diversas citoquinas precursoras. Debido a este único mecanismo de acción y su significativa actividad *in vitro*, los flavonoides se consideran como los candidatos favoritos para nuevos medicamentos antiinflamatorios. Sin embargo todavía se requieren estudios adicionales *in vivo* para establecer el valor terapéutico de los flavonoides en las enfermedades inflamatorias. (25)

Todos los flavonoides poseen un origen biosintético común y un mismo elemento estructural básico, un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆. Además, son estructuras hidroxiladas en el anillo aromático y por tanto son polifenólicas. Se les pueden encontrar como aglicones libres o en forma de heterósidos, unido a azúcares. (23), (26)

La mayoría de aglicones son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos como el etanol y metanol, mientras que los heterósidos son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas. Sin embargo, en general los flavonoides son insolubles en éter de petróleo. (22)

Las leucoantocianidinas son solubles en agua pero pueden extraerse con acetato de etilo; al hervirlas con ácido clorhídrico 2N dan un color rojo. (26)

La identificación de flavonoides se puede realizar por reacciones de coloración y por cromatografía en capa fina. Según estudios de O. Look, la reacción más usual para la identificación de flavonoides en un extracto es la reacción de Shinoda, donde se desarrolla una coloración inmediata que varía del rojo al violeta, a excepción de los flavonoides del tipo chalcona y aurona que no dan coloración. Otras reacciones que evidencian la presencia de flavonoides son las reacciones coloreadas que forman complejos con los metales de Fe^{3+} (coloración azul – verde) y Al^{3+} (coloración amarillo) debido a sus funciones fenóles. (22), (27).

En la identificación por cromatografía en capa fina (CCF), se utilizan sistemas de solventes como BAW: n-butanol: ácido acético: agua, 4:1:5 v/v o en otras proporciones, estas proporciones pueden aumentar o disminuir según el grado de hidroxilación de los flavonoides. Para cromatografías bidimensionales se emplea generalmente como segundo disolvente ácido acético al 6%. Para las leucoantocianidinas y sus aglicones se emplean adicionalmente el disolvente Forestal, mezcla compuesta de ácido acético, agua y ácido clorhídrico en las proporciones de 30:10:3 v/v.

Debido a los diferentes reveladores que pueden ser usados, Domínguez (26) recomienda proceder de la siguiente manera: observar las manchas visibles (auronas, charconas, antocianinas); examinar con luz UV (300 nm) manchas fluorescentes (flavonoides, charconas) o manchas oscuras; exponer las manchas a vapores de amoníaco y examinarlas nuevamente con luz UV (las flavonas y glicósidos flavonólicos presentan fluorescencia amarilla, las flavononas se ven amarillas y las catequinas azul claro); observar nuevamente las manchas a la luz normal (las

antocianinas se ven azul grisáceo, las flavonas amarillas, las charconas y auronas naranja-rojo); y, debido a que los vapores de amoníaco desaparecen en un determinado tiempo, se pueden efectuar otras pruebas con agentes cromogénicos como una solución al 1% de FeCl_3 que revela la presencia de los compuestos fenólicos y una solución de AlCl_3 que al calentar y observar a luz UV revela la presencia de flavonoides como manchas amarillas. (26), (27)

2.3.3 Compuestos triterpénicos y/o esteroídicos

Los triterpenoides son compuestos de 30 carbonos, basados en seis unidades de isopreno, se pueden encontrar como glicósidos formando parte de las saponinas triterpénicas. (27)

Los esteroides son compuestos de 27 carbonos cuyo esqueleto fundamental corresponde al ciclopentano-perhidrofenantreno, están biogenéticamente relacionados con los triterpenoides, y se pueden encontrar formando parte de las saponinas esteroídicas y glicósidos cardíacos, o como esteroalcaloides y hormonas esteroideas (fitoesteroles). (26), (27)

En cuanto a las saponinas triterpénicas y esteroídicas, a las plantas que presentan estos compuestos se les atribuyen diferentes efectos farmacológicos siendo los principales: el efecto expectorante y el efecto diurético. También se les atribuye un efecto antiedematoso y antiinflamatorio sobre todo a nivel de las extremidades inferiores en la insuficiencia venosa; como también un efecto antihemorroidal, cicatrizante, y un efecto antimicrobiano, antivírico y antimicóticos. (22)

En general, para la identificación de estructuras triterpénicas y/o esteroídicas se utilizan diversos métodos como las reacciones de coloración y cromatografías en capa fina. Una de las reacciones de coloración más utilizadas para identificar la presencia de estos compuestos es la reacción de Liebermann-Burchard, donde las saponinas triterpénicas dan coloración rosada o púrpura mientras que las esteroídicas dan coloraciones azul – verdosas. Para la detección por cromatografía en capa fina, algunos autores recomiendan como sistemas de solventes la combinación de benceno:

acetato de etilo (1:1); cloroformo: acetato de etilo (1:1) y cloroformo: etanol (19:1) y como agente cromogénico son frecuentes el uso del revelador Liebermann-Burchard, H_2SO_4 concentrado o al 50% y vapores de yodo. (27)

Los glicósidos cardiacos también llamados heterósidos cardiotónicos son compuestos que tienen la capacidad de ejercer una acción fuerte y específica sobre los músculos cardiacos. Además, son compuestos relativamente polares y pueden ser identificados por sus azúcares con la reacción de Keller-Kiliani dando un anillo pardo en la interfase y una coloración azul-verdosa en la capa acética. (22), (27)

2.3.4 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos nitrogenados de estructuras heterogéneas y complejas, mayormente con carácter básico y que tienen acciones fisiológicas diversas aún en dosis muy bajas, llegando incluso a ser tóxicas. Constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios en las plantas y se originan principalmente a partir de los aminoácidos. (22), (26), (27)

Los alcaloides se pueden encontrar distribuidos sobre todo en los vegetales superiores en tejidos periféricos como cortezas, raíces, frutos, hojas y semillas. Las especies que contienen alcaloides rara vez contienen solo un alcaloide, habitualmente contiene varios, atribuyéndoles diversas acciones farmacológicas, como la acción antitumoral, estimulante, hipotensora, antibacterial, analgésica y antiinflamatoria. (22), (27)

Estos alcaloides se pueden encontrar distribuidos en los vegetales al estado libre, como glicósidos o como sales de ácidos orgánicos. (22), (27)

En su forma libre los alcaloides son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos (alcoholes), mientras que los alcaloides en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas. Al emplearse mezclas hidroalcohólicas (etanol 70% v/v) se logra solubilizar los alcaloides tanto en su forma de sal como en su forma libre.

Para la detección de los alcaloides se tienen diferentes reacciones generales de identificación, como las reacciones de precipitación basadas en la combinación de alcaloides con metales pesados, estas reacciones se llevan a cabo en soluciones acuosas ácidas, siendo los reactivos más utilizados el reactivo de Mayer que da un precipitado o coloración blanco amarillenta, Bertrand que da un precipitado marrón, Bouchardat que da un precipitado amarillo, Wagner que da un precipitado pardo rojizo y Dragendorff que da un precipitado anaranjado rojizo. (26), (27)

Algunos autores indican que debido a que la detección de alcaloides mediante las reacciones de precipitación puede dar falsos positivos o falsos negativos, sólo se puede considerar positivo si dan reacciones con 4 de estos reactivos. (26), (27)

2.4 Aspectos tecnológicos

2.4.1 Obtención de la materia prima

Para obtener las sustancias contenidas en las plantas y transformarlas en medicamentos existen dos procedimientos fundamentales: procedimiento por expresión y el procedimiento de extracción. (28)

El procedimiento de expresión es utilizado para la obtención de jugos y zumos, y emplea como materia prima plantas frescas troceadas. (28)

El procedimiento de extracción utiliza también plantas troceadas o materiales vegetales desecados que son tratados con un líquido extractivo. Como líquidos extractivos se utilizan casi siempre mezclas de etanol y agua. (28)

En el proceso de extracción se distinguen dos fases fundamentales:

- Fase de lavado, las sustancias activas pasan casi instantáneamente al disolvente, ya que las células liberadas por el proceso de trituración, y en cierta proporción destruidas, entran en contacto directo con el disolvente.

- Fase de extracción, para disolver los componentes de las células intactas, el disolvente tiene que penetrar primero en ellas. Las membranas celulares arrugadas y secas existentes en la droga deben pasar en primer lugar a un estado de esponjamiento, que permita el paso del disolvente al interior de las células. Estos fenómenos son favorecidos en gran medida por el agua. Las mezclas hidroalcohólicas, como las utilizadas preferentemente para la fabricación de preparados farmacéuticos, también se muestran especialmente ventajosas en este sentido. (28)
- Luego las sustancias endocelulares pasan al líquido extractivo por difusión a través de la membrana hasta alcanzar el equilibrio de concentración entre las soluciones situadas al interior y al exterior de la célula. (28)

2.4.1.1 Maceración

Este procedimiento requiere que la droga triturada sea incorporada al líquido de extracción. Asimismo, el conjunto debe ser protegido de la luz solar directa y agitado repetidamente. El tiempo de maceración es variable pudiendo estar entre 4 a 10 días, pero con unos 5 días suelen ser suficientes. La agitación es importante en el proceso para favorecer la difusión de las sustancias endocelulares, y por ello es recomendable agitar el conjunto 3 veces al día aproximadamente. (28)

Cuanto mayor es la relación entre el líquido extractivo y la droga, será más favorable el rendimiento. Después de la maceración se filtra el conjunto exprimiendo el residuo. También se recomienda lavar el residuo con el agente extractivo para recuperar las sustancias extractivas retenidas. Se reúnen todos los líquidos extractivos para ser filtrado y decantado. (28)

2.4.1.2 Dimaceración

En este procedimiento la droga se macera dos veces con el mismo disolvente, la primera vez con la mitad y después con la otra parte. Con este procedimiento se mejora ligeramente el

rendimiento. Sin embargo, es más recomendable utilizar primero una pequeña proporción del disolvente (20%) y luego el resto. (28)

2.4.1.3 Maceración con agitación

En este procedimiento se agita intensamente el material en maceración con un agitador mecánico, de esta forma no se mejora el resultado de la extracción pero en cambio se reduce el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de concentraciones, acortando el tiempo total de extracción.

(28)

2.4.2 Formas farmacéuticas de aplicación tópica:

2.4.2.1 Gel (Bases hidrosolubles)

Los geles son sistemas semisólidos compuestos de suspensiones de partículas inorgánicas pequeñas o de moléculas orgánicas grandes interpenetradas por un líquido. (29)

Los geles son sistemas generalmente tixotrópicos, formando semisólidos en reposo y convirtiéndose en líquidos al agitarlos. La propiedad semisólida es proporcionada por la estructura continua. (29), (30)

Asimismo, los geles son generalmente transparentes o translúcidos y por naturaleza polar, estos preparados tienen un efecto refrescante debido a la rápida evaporación de agua, dejando en algunos casos una película fina y transparente. (31)

La obtención de los geles se hace mediante un polímetro natural o sintético, conocido como gelificante, a una concentración baja. Este gelificante forma una matriz tridimensional en el seno del líquido hidrófilo, también se puede gelificar un líquido mediante sustancias disueltas, las cuales debido a sus características electroquímicas forman una matriz tridimensional, confiriéndoles viscosidad. El complejo puede ser transparente o turbio debido a que el polímetro no se disuelve totalmente o por la formación de agregados que dispersan la luz. (30)

2.4.2.2 Crema

Las cremas, según definición que le otorga la USP, son formas farmacéuticas semisólidas que contienen uno o más fármacos disueltos o dispersos en una base adecuada, con consistencia relativamente líquida formulados como emulsión de agua en aceite o aceite en agua (29)

Las cremas se estabilizan mediante agentes emulsificantes que impiden la coalescencia (fusión de pequeñas gotas en gotas más grandes y por último en una fase única separada). Los agentes emulsificantes cumplen con su función concentrándose en la interfase entre la gota y la fase externa y formando una barrera física alrededor de la partícula, asimismo reducen la tensión de las fases facilitando la emulsificación al mezclar. (29)

2.4.2.2.1 Crema o/w (Bases lavables con agua)

Se formulan a partir de emulsiones aceite en agua, donde el aceite es la fase dispersa y la solución acuosa la fase continua. (29)

Estas cremas pueden ser formadas por polímeros hidrofílicos naturales, sintéticos y semisintéticos junto con los agentes tensoactivos, ya que se acumula en la interfase y aumenta la viscosidad de la fase acuosa. (29)

Para obtener la consistencia semisólida, no es necesario tener una elevada relación de volumen entre la fase interna y la fase externa. Estas cremas generalmente se preparan en estado líquido a elevadas temperaturas, y luego se enfrían a temperatura ambiente para logra la solidificación de la fase interna. (29)

Además, requiere de la adición de un agente antimicrobiano ya que la fase acuosa promueve la proliferación de microorganismos.

2.4.2.2.2 Crema w/o (Bases de absorción)

Se obtienen por adición de agua o soluciones acuosas a la base de absorción, la fase acuosa queda emulsionada como fase interna, su consistencia es variable y depende de los componentes de ambas fases. (30)

Generalmente se denominan cremas grasas, debido a que dejan una sensación untuosa al aplicarlos a la piel, dejando la piel grasosa y brillante. (30)

Estas cremas son lubricantes y emolientes, de utilidad en procesos dermatológicos subagudos y crónicos por la propia acción emoliente del vehículo. (30)

Para conferirle una mayor consistencia se adicionan sustancias que son sólidas a temperatura ambiente (ceras, alcoholes de alto peso molecular), por lo que requiere ser trabajado en caliente y por encima de la temperatura de fusión. (30)

2.4.2.2.3 Crema-gel

Se utilizan hidrocoloides como agentes emulsificantes en emulsiones O/W, de esta forma además de formar capas multimoleculares alrededor los glóbulos dispersos también se estabiliza la emulsión al incrementar al mismo tiempo la viscosidad de la fase continua o dispersante. (31)

Estos hidrocoloides no tienen la desventaja de alterar la densidad de la fase continua. Por ejemplo, la inclusión de metilcelulosa reduce la movilidad de los glóbulos de grasa en emulsiones O/W. (31)

2.4.2.3 Bases hidrocarbonadas (bases oleosas para ungüentos)

Son preparados semisólidos destinados para la aplicación externa, sobre la piel y membranas mucosas. Son soluciones o dispersiones de uno o más activos.

Las bases hidrocarbonadas son vehículos usados principalmente cuando se desea producir un efecto farmacológico en el sitio de aplicación o de manera local. Idealmente estas bases no producen irritación o sensibilización a la piel. (32)

Las bases hidrocarbonadas sólo permiten una incorporación mínima de componente acuoso. Sirve para mantener los medicamentos en contacto prolongado por sus características altamente oclusivas. Son difíciles de eliminar, pero tienen buenas propiedades emolientes. (29)

2.4.2.4 Pastas

Son formas farmacéuticas semisólidas de aplicación tópica que contienen uno o más fármacos, compuestas principalmente por fino polvo insoluble en concentraciones de 20% hasta 60%. Las pastas no fluyen a temperatura del cuerpo por lo que sirven como recubrimiento protector sobre el área de aplicación

Las pastas son menos oleosas y más absorbentes que los ungüentos debido a su alta proporción de sólidos. Asimismo, tienden a absorber las secreciones serosas y son menos penetrantes y oclusivas que los ungüentos por lo que se las prefiere para lesiones agudas con tendencia a la formación de costras, vesículas o exudados. (29, 32)

2.4.3 Pre-formulación de formas farmacéuticas de aplicación tópica con efecto antiinflamatorio

2.4.3.1 Consideraciones generales para la selección de Vehículos

Los vehículos para aplicación tópica deben tener una serie de características farmacotécnicas que están directamente relacionadas a las condiciones de uso (objetivo terapéutico, naturaleza de la lesión, propiedades fisicoquímicas y biológicas del activo).

Los criterios a evaluar en estas formulaciones incluyen:

- pH: debe ser neutro o débilmente ácido, próximo al pH de la piel
- Estabilidad física y química así como compatibilidad con los activos
- Debe tener buena extensibilidad y adaptabilidad a la superficie de la piel y cavidades cutáneas.

El flujo recomendable es plástico-tixotrópico

- Se prefiere que sean fácilmente eliminables de las zonas tratadas por simple lavado.
- No deben manchar
- No deben tener efectos de irritación primaria ni sensibilización a la piel
- Características específicas para un efecto antiinflamatorio agudo (no oclusivo, refrescante)
- Buena miscibilidad vehículo/emulsión epicutánea.
- Buena penetración
- Buena capacidad de cesión difusa de los activos
- Posibilidad de resistir a la esterilización
- Buena adherencia ⁽³⁰⁾

2.4.3.2 Consideraciones generales para la selección de la forma farmacéutica

La sensación de quemazón local y tirantez que acompaña a los procesos inflamatorios cutáneos se mitigan por la aplicación de ungüentos refrescantes. El efecto refrigerante se debe a la evaporación de agua presente en los ungüentos, siendo preferidos las cremas O/A y los geles, debido a que presentan una mayor proporción de agua.

En las cremas O/A se utilizan sobre todo emulsificantes solubles en agua y muchas veces se busca estabilizar la fase externa de esta preparación con la adición de un agente gelificante (crema-gel).

(28)

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales, equipos y reactivos

3.1.1 Muestra a evaluar

Hojas de *Baccharis latifolia* “chilco”

3.1.2 Material biológico

Ratones albinos hembras de la especie *Mus musculus* y de la cepa Balb/c/CNPB, de aproximadamente 1,5 a 2 meses de edad y peso entre 25 a 30g.

3.1.3 Materiales de vidrio y metal

Los materiales empleados incluyen: jeringas descartables de 1mL, agujas desechables N° 26G, algodón medicinal, balones, baguetas, cámara cromatográfica, gradillas, embudo, espátulas, matraces, mechero Bunsen, pinzas, placas de vidrio, probetas, recipiente de vidrio de 5L de capacidad, soporte universal, tubos de ensayo, vaso de precipitación.

3.1.4 Equipos

Los equipos empleados incluyeron: balanza analítica Mettler Toledo® PB3001, baño maría Memmert®, cocinilla eléctrica, estufa de lecho estático Memmert®, estufa de lecho estático Mettler®, lámpara UV, molino de cuchilla con malla N° 14, pletismómetro manual, potenciómetro Orion® 420 A+, rotavapor Büchi®.

3.1.5 Reactivos

Los reactivos empleados fueron: acetato de etilo, acetona, ácido acético concentrado, ácido clorhídrico 10N, ácido sulfúrico 50%, agua destilada, agua purificada, amoníaco, benceno, n –

butanol, carragenina lambda (Laboratorios SIGMA), cloroformo, etanol 96% v/v, éter de petróleo, n – hexano, metanol, reactivo agua de bromo, reactivo antrona, reactivo Bertrand, reactivo Borntrager, reactivo Bouchardat, reactivo Dragendorff, reactivo gelatina, reactivo Keller-Killiani, reactivo Liebermann-Burchard, reactivo Mayer, reactivo ninhidrina, reactivo Rosenheim, reactivo Shinoda, reactivo tricloruro férrico, revelador Dragendorff, revelador Liebermann-Burchard, revelador tricloruro férrico, revelador tricloruro de aluminio, silicagel 60 G, solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 10%, sulfato de sodio (Na₂SO₄).

3.2 Metodología

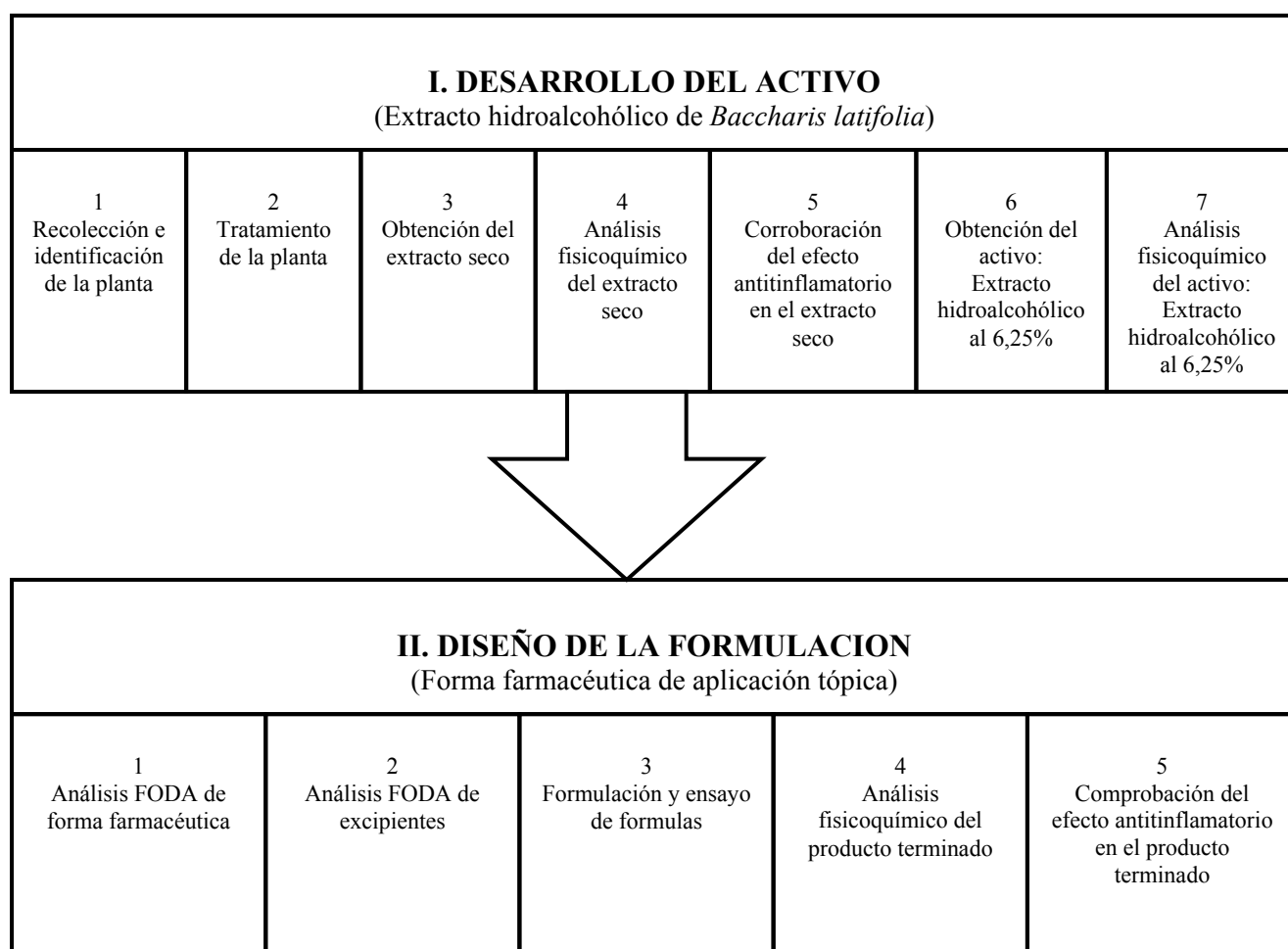


Diagrama 1. Principales etapas de desarrollo del trabajo

3.2.1 Desarrollo del activo (Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*)

3.2.1.1 Recolección e identificación de la planta

Se recolectaron las hojas de especie *Baccharis latifolia* en el departamento de Amazonas, provincia Rodríguez De Mendoza (altura 1600 m.s.n.m), confirmandose su identidad con el certificado emitido por el Museo de Historia Natural (ver Anexo)

3.2.1.2 Tratamiento de la planta. (Diagrama 2)

Secar las hojas frescas en la zona de recolección bajo el resguardo del sol a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 horas. En el laboratorio de trabajo limpiar las hojas con alcohol etílico 96° v/v y algodón medicinal, secar las hojas en una estufa de lecho estático a temperatura de 60°C por un tiempo de 8 horas con ventilado, 18 horas sin ventilador y nuevamente 2,5 horas con ventilador. Finalmente, triturar las hojas secas en un molino de cuchillas con malla N° 14.

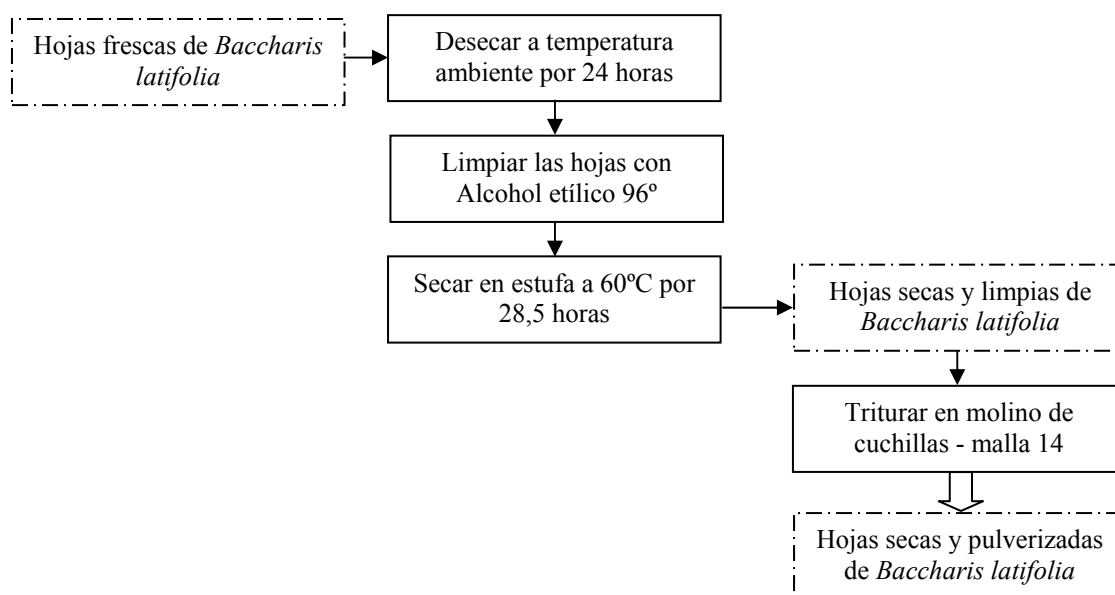


Diagrama 2. Tratamiento de la planta

3.2.1.3 Obtención del extracto seco de *Baccharis latifolia* (Diagrama 3)

- Primera maceración: pesar 0,369 kg de planta desecada y pulverizada, adicionar 1800mL de etanol al 96% y cantidad suficiente de agua purificada para 2460mL (etanol 70% v/v). Macerar con agitación intermitente durante 72 horas, filtrar el sobrenadante y guardarlo en un recipiente de vidrio de 5L de capacidad.

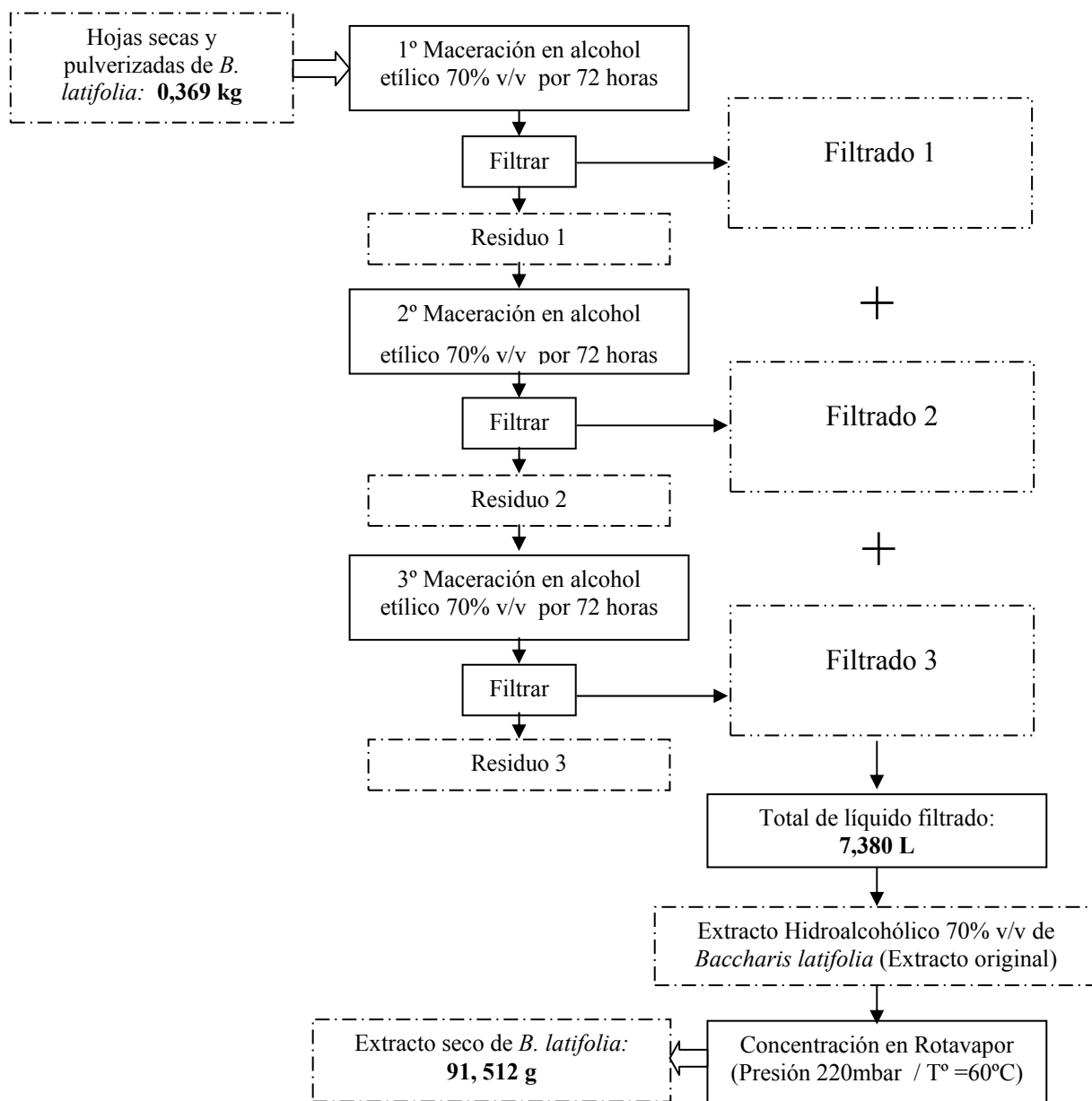


Diagrama 3. Obtención del extracto seco de *Baccharis latifolia*

- Segunda maceración: adicionar 1800mL de etanol al 96% y cantidad suficiente de agua purificada para 2460mL (etanol 70% v/v). Macerar con agitación intermitente durante 72 horas. Filtrar el sobrenadante y adicionarlo al recipiente de vidrio de la primera maceración.
- Tercera maceración: adicionar 1800mL de etanol al 96% y cantidad suficiente de agua purificada para 2460mL (etanol 70% v/v). Macerar con agitación intermitente durante 72 horas. Filtrar el sobrenadante y adicionarlo al recipiente de vidrio de la primera maceración.
- Concentración del extracto hidroalcohólico en rotavapor Bücci® por cada parcial de 500mL
 - Presión: 113mbar
 - Temperatura de baño: 60° C
 - Rotación: 110 rpm
 - Volumen inicial: 500 mL
 - Peso neto final: 6,2g

3.2.1.4 Análisis fisicoquímico del extracto seco de *Baccharis latifolia*

3.2.1.4.1 Prueba de solubilidad

- Muestra problema: Extracto seco de *Baccharis latifolia*
- Procedimiento: colocar en un tubo de ensayo 0,5 g de extracto seco de *Baccharis latifolia* y adicionar 2ml de solvente, agitar por 2 minutos.
- Solventes utilizados: agua destilada, etanol, metanol, n-butanol, acetato de etilo, cloroformo, ácido acético, benceno, acetona, éter de petróleo, n-hexano

3.2.1.4.2 Marcha fitoquímica (Diagrama 4)

Instalaciones: Laboratorio de Farmacognosia y Medicina tradicional, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

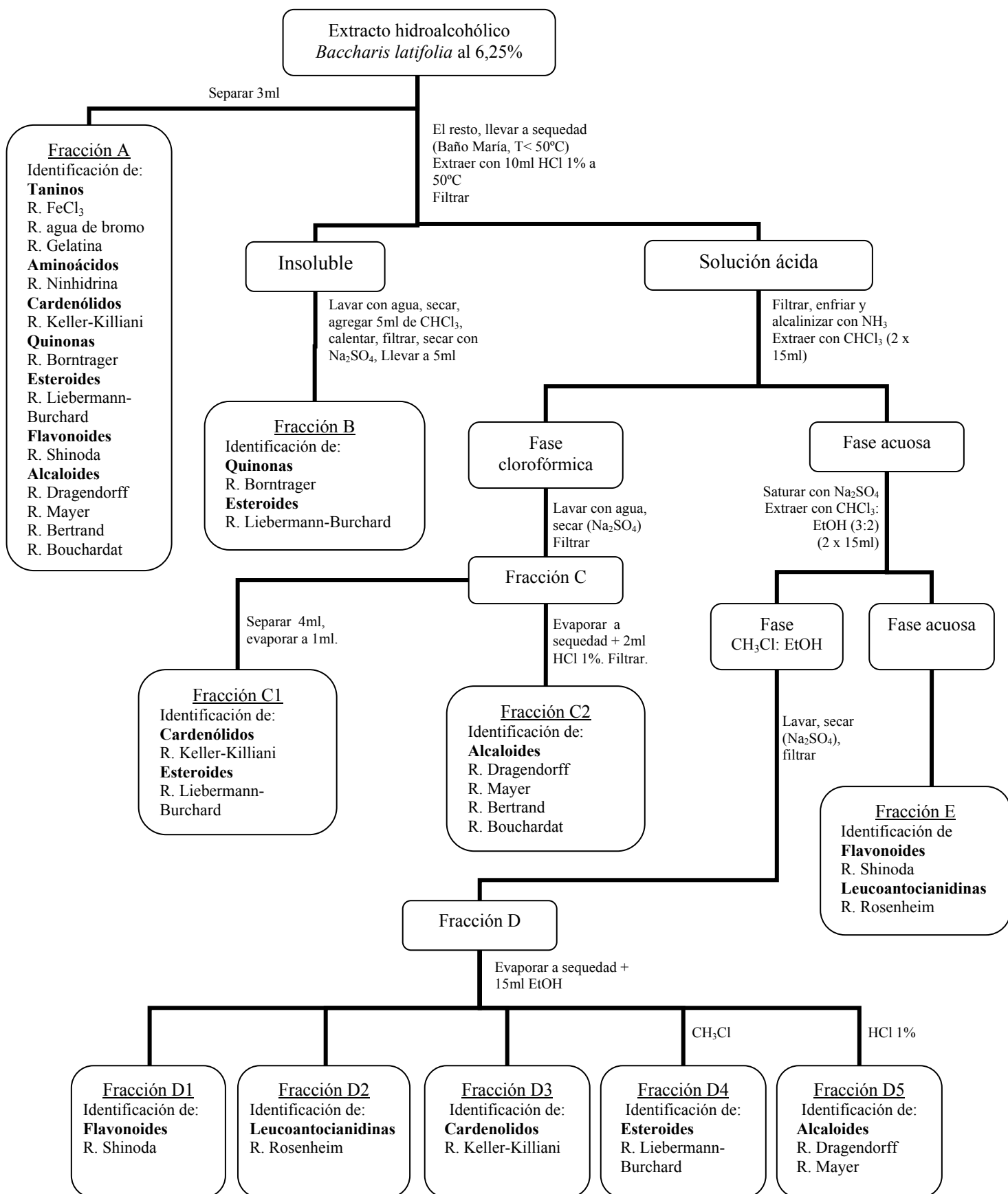


Diagrama 4. Marcha fitoquímica según Olga Look (27)

3.2.1.4.3 Identificación cromatográfica

Instalaciones: Laboratorio de Investigación de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Identificación de triterpenos y/o esteroides

1. Muestra: Extracto seco de *Baccharis latifolia*
2. Preparación de la muestra: Utilizar 3,5g de extracto seco de *Baccharis latifolia*, adicionar 5,3mL de ácido clorhídrico 10N e hidrolizar por 1 hora. Separar el residuo y redissolver con cloroformo en cantidad suficiente (aproximadamente 15mL). Lavar con 10mL de agua destilada; 20mL de NaHCO₃ al 10%; y, nuevamente con 10mL de agua destilada. Secar con Na₂SO₄ anhidro, adicionar en polvo hasta que el sobrenadante permanezca translúcido. Decantar y separar el sobrenadante. Concentrar la fase orgánica en baño maría (baño maría Memmert®) a 38,7°C hasta un volumen de 6 a 4mL.
3. Cromatografía en capa fina:
 - a. Sistema de solventes: benceno: acetato de etilo (2: 1)
 - b. Soporte: silicagel 60 G
 - c. Revelador:
 - i. Liebermann – Burchard: calentar en estufa a 60° C por 2 minutos. Llevar a UV y ver la fluorescencia a 254 y 365nm.
 - ii. H₂SO₄ al 50%: calentar en estufa a 60° C por 2 minutos. Llevar a UV y ver la fluorescencia a 254 y 365nm.

Identificación de flavonoides

1. Muestra: Extracto seco de *Baccharis latifolia*
2. Preparación de muestra: Utilizar 3,5g de extracto seco de *Baccharis latifolia* y reconstituir con 5ml de etanol 70% v/v.

3. Cromatografía en capa fina:

- a. Sistema de solventes: CHCl₃: metanol (9: 1); CHCl₃: metanol (5:1); CHCl₃: metanol (1: 1); BAW (4: 1: 5); BAW (5: 4: 1); BAW (6: 1: 2) ; BAW (6: 1: 3); BAW (8: 1: 2); acetato de etilo: ácido acético: H₂O: metanol (10: 2: 2: 1); CHCl₃: metanol: H₂O (65: 45: 12); Forestal [H₂O: ácido acético: HCl (30: 10: 3)]
- b. Soporte: Silicagel 60 G
- c. Revelador:
 - i. UV: calentar previamente por 5 minutos en estufa a 60° C, luego observar bajo la luz UV a 254nm y a 365nm.
 - ii. Amoníaco: exponer el cromatograma a los vapores de amoníaco, llevar a la luz UV (254nm y 365nm) y observar la variación en la intensidad de las manchas observadas sólo frente a la luz UV.
 - iii. Tricloruro de aluminio: aspersar el revelador, calentar en estufa por 5 minutos a 60° C, observar las manchas fluorescentes bajo la luz UV (254nm y 365nm)

Identificación de alcaloides

1. Muestra: Extracto seco de *Baccharis latifolia*
2. Preparación de muestra: Utilizar 3,5g de extracto seco de *Baccharis latifolia* y reconstituir con 20mL de ácido acético al 10%. Adicionar amoníaco hasta alcanzar pH 10, adicionar 15mL de cloroformo y separar la fase orgánica. Concentrar la fase orgánica en baño maría a 38,7° C hasta un volumen de 5mL.
3. Cromatografía en capa fina:
 - a. Soporte: silicagel 60 G
 - b. Sistema de solventes: metanol: NH₃ (200:3) y acetato de etilo: metanol: H₂O (100: 13,5: 10)
 - c. Revelador: Dragendorff

3.2.1.5 Corroboración del efecto antiinflamatorio en el extracto seco: (33, 34, 35)

Instalaciones: Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Modelo de experimentación: Método del edema plantar por carragenina (creado por Winter *et al*, modificado por Sugishita).

- Muestra problema: Extracto seco de *Baccharis latifolia*
- Animales de experimentación: 36 especímenes de *Mus musculus* (ratón albino) divididos en seis grupos: control, D1, D2, D3, D4 y D5. La muestra está constituida por animales de la cepa Balb/c/CNPB, hembras de 1,5 a 2 meses de edad y de aproximadamente 25 a 30g de peso.
- Preparación de muestras problema: Diluir con etanol 70% v/v el extracto seco de *Baccharis latifolia* para obtener 5ml de extracto hidroalcohólico en las siguientes concentraciones para los diferentes grupos: D1= 1,25mg/0,1g; D2 = 2,5mg/0,1g; D3 = 3,75mg/0,1g; D4 = 5mg/0,1g; D5 = 7mg/0,1g
- Fundamento del método: Se basa en la inducción de la inflamación por inyección subplantar de una suspensión de carragenina al 1%, cuyo principal signo es la formación de edema en la pata posterior derecha del ratón, el cual es medido en el pletismómetro manual.
- Procedimiento:
 - a. Aplicación tópica a cada grupo según lo descrito:
 - i. Grupo control: 0,1g de mezcla hidroalcohólica al 70% v/v
 - ii. Grupos D1 a D5: 0,1 g de las diluciones de *Baccharis latifolia* preparadas previamente.
 - b. Una hora después de administrada las muestras, inyectar en la aponeurosis plantar derecha del ratón 0,05ml de solución de carragenina 1% suspendido en NaCl 0,9%, medir inmediatamente después el volumen de la pata en el pletismómetro manual.

- c. Continuar con las mediciones del volumen de la pata a las 1, 2, 3, 5 y 7 horas después de inyectado la carragenina.
- d. El porcentaje de inhibición de la inflamación se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición fase aguda} = [(X \text{ control} - X \text{ problema}) / X \text{ control}] \times 100$$

- Análisis estadístico: La dosis efectiva media (DE_{50}) se calcula de la recta de regresión semilogarítmica y sus límites de confianza. Se determina la significación estadística entre los grupos tratados con el extracto y el grupo control con el análisis de varianza (ANOVA).

3.2.1.6 Obtención del activo (Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* de concentración óptima)

Determinación de la concentración óptima del extracto de *Baccharis latifolia* en base a la los siguientes criterios:

- Concentración del extracto seco en el producto terminado: La concentración del extracto hidroalcohólico debe ser suficiente para que al ser incorporado en la forma farmacéutica seleccionada permita obtener la concentración elegida en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio.
- Solubilidad del extracto seco: Todos los componentes debe estar disueltos en la mezcla hidroalcohólica 70% v/v.
- Facilidad de incorporación en la preparación de la forma farmacéutica tópico: Como máximo el extracto debe constituir el 50% del producto terminado para permitir que el 50% restante sea constituido por los excipientes.

3.2.1.7 Análisis fisicoquímico del activo (Extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* de concentración óptima)

Evaluar: Aspecto, densidad, pH, sólidos totales, porcentaje de alcohol e identificación cromatográfica de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos, flavonoides y alcaloides.

3.2.2 Diseño de la formulación

3.2.2.1 Análisis FODA de formas farmacéuticas tópicas

Criterio de selección de la forma farmacéutica: factibilidad de fabricación, aspecto, facilidad de lavado, compatibilidad con el extracto, costo, estabilidad y seguridad.

3.2.2.2 Análisis FODA de excipientes

Criterio de selección de los excipientes: compatibilidad, aspecto, solubilidad, estabilidad y seguridad

3.2.2.3 Formulación y ensayo de fórmulas

Instalaciones: Laboratorio de Farmacotecnia y Administración farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

3.2.2.4 Análisis fisicoquímico del producto terminado

Instalaciones: Laboratorio de Farmacotecnia y Administración farmacéutica y laboratorio de Investigación de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

3.2.2.4.1 Análisis físico: aspecto, pH, material de empaque primario

3.2.2.4.2 Identificación cromatográfica

Identificación por cromatografía de capa fina de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos

1. Muestras:

- Producto: Crema-gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%
- Estándar: Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 6,25% diluido al 2,5% con etanol al 70% v/v.
- Blanco: Placebo de Crema-gel

2. Preparación de la muestra: Utilizar 18g de cada muestra y adicionar 10mL de ácido clorhídrico 10N e hidrolizar por 1 hora. Luego colocar cada muestra hidrolizada en una pera de bromo y extraer con 20mL de cloroformo, divididos en 4 parciales de 5mL cada una, coleccionar las fases clorofórmicas y lavar con: 10mL de agua destilada; 20mL de NaHCO₃ al 10%; y, 10mL de agua destilada. Secar con Na₂SO₄ anhidro (adicionar en polvo hasta que el sobrenadante permanezca traslúcido), decantar y separar el sobrenadante. Concentrar la fase orgánica en baño maría (baño maría Memmert®) a 38,7°C hasta un volumen de 4 a 2mL
3. Cromatografía en capa fina:
 - a. Sistema de solventes: Benceno: Acetato de etilo (2: 1)
 - b. Soporte: Silicagel 60 G
 - c. Revelador:
 - i. Liebermann – Burchard: calentar en estufa a 60° C por 2 minutos. Llevar a UV y ver la fluorescencia a 365nm.
 - ii. H₂SO₄ al 50%: calentar en estufa a 60° C por 2 minutos. Llevar a UV y ver la fluorescencia a 365nm.

3.2.2.5 Comprobación del efecto antiinflamatorio del producto terminado: (33, 34, 35)

Instalaciones: Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Modelo de experimentación: Método del edema plantar por carragenina (creado por Winter et al, modificado por Sugishita).

- Muestra problema: Crema-gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%
- Animales de experimentación: 24 especímenes de *Mus musculus* (ratón albino) divididos en 4 grupos: placebo del extracto, placebo de la formulación, extracto y formulación. La muestra está constituida por animales de la cepa Balb/c/CNPB, hembras de 3 a 4 meses de edad y de aproximadamente 25 a 30g de peso.

- Preparación de muestras:
 - a. Formulación: Crema-gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%
 - b. Extracto: Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 2,5%
 - c. Placebo de extracto: Mezcla hidroalcohólica 70% v/v.
 - d. Placebo de la formulación: Base de crema-gel
- Fundamento del método: Se basa en la inducción de la inflamación por inyección subplantar de una suspensión de carragenina al 1%, cuyo principal signo es la formación de edema en la pata posterior derecha del ratón, el cual es medido en el pletismómetro manual.
- Procedimiento:
 - a. Aplicación tópica a cada uno de los grupos según lo descrito:
 - i. Formulación: 0,1g Crema-gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%
 - ii. Extracto: 0,1g extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 2,5%
 - iii. Placebo de extracto: 0,1g mezcla hidroalcohólica 70% v/v.
 - iv. Placebo de la formulación: 0,1g base de crema-gel
 - b. Una hora después de administrada las muestras, inyectar en la aponeurosis plantar derecha del ratón 0,05ml de solución de carragenina 1% suspendido en NaCl 0,9%, medir inmediatamente después el volumen de la pata en el pletismómetro manual.
 - c. Continuar con las mediciones del volumen de la pata a las 1, 2, 3, 5 y 7 horas después de inyectado la carragenina.
 - d. El porcentaje de inhibición de la inflamación se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición fase aguda} = [(X \text{ control} - X \text{ problema}) / X \text{ control}] \times 100$$
- Análisis estadístico: La significación estadística entre los grupos tratados y el grupo control, se calcula a través de la prueba de t-Student, para muestras independientes.

IV. RESULTADOS

4.1 Desarrollo del activo (Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*)

4.1.1 Análisis fisicoquímico de extracto seco de *Baccharis latifolia*

Cuadro 1. Prueba de solubilidad (Foto 5)

Solventes	Resultado
Agua destilada	Soluble
Etanol	muy soluble
Metanol	muy soluble
n-butanol	muy poco soluble
Acetato de etilo	poco soluble
Cloroformo	poco soluble
Ácido acético	Soluble
Benceno	poco soluble
Acetona	muy poco soluble
Éter de petróleo	muy poco soluble
n-hexano	Insoluble

Cuadro 2. Marcha fitoquímica (Fotos 6 a 19)

Compuesto	Reactivo	Resultado	Calificación
Compuestos fenólicos	R. FeCl ₃	Precipitado verde	++++
Taninos Catéquicos	R. agua de bromo	Precipitado	+++
Taninos	R. gelatina	Precipitado blanco	++
Aminoácidos y grupos aminos	R. Ninhidrina	Coloración morado	++++
Cardenólidos	R. Keller-Killiani	Anillo rosa	-
Quinonas	R. Borntrager	Amarillo	-
Flavonoides	R. Shinoda	Coloración Ligeramente rojizo	+
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado naranja	+++
Alcaloides	R. Mayer	Precipitado Blanco	+++
Alcaloides	R. Bertrand	Precipitado Marrón	+++
Alcaloides	R. Bouchardat	Precipitado amarillo	+++
Compuestos triterpénicos y/o esteroídicos	R. Liebermann-Burchard	Anillo pardo coloración verde azulada	++++
Leucoantocianidinas	R. Rosenheim	Coloración roja intensa	+++

Cuadro 3. Identificación cromatográfica de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos (Fotos 20 a 25)

Método	Cromatografía en capa fina	
Sistema de solventes:	Benceno: Acetato de etilo (2: 1)	
Revelador:	Lieberman – Burchard y H ₂ SO ₄ al 50%	
Rf:	Placa 1 Rf (Rev. Liebermann-Burchard) = 0,92 Rf (Rev. Ác. sulfúrico 50%) = 0,93	Placa 2 Rf (Rev. Liebermann-Burchard) = 0,97 Rf (Rev. Ác. sulfúrico 50%) = 0,97

Cuadro 4. Prueba de sistema de solventes para la identificación cromatográfica de flavonoides

Sistema de Solventes para flavonoides	Resultados
CHCl ₃ : MeOH (9: 1)	No conforme
CHCl ₃ : MeOH (5:1)	No conforme
CHCl ₃ : MeOH (1: 1)	No conforme
BAW (4: 1: 5)	No conforme
BAW (5: 4: 1)	No conforme
BAW (6: 1: 2)	No conforme
BAW (6: 1: 3)	No conforme
BAW (8: 1: 2)	No conforme
Acetato de etilo: Ac. Acético: H ₂ O: MeOH (10: 2: 2: 1)	No conforme
CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (65: 45: 12)	No conforme
Forestal - H ₂ O: Ac. Acético: HCl (30: 10: 3)	Conforme

Cuadro 5. Identificación cromatográfica de flavonoides (Foto 26)

Método	Cromatografía en capa fina
Sistema de solventes:	Forestal - H ₂ O: Ac. Acético: HCl (30: 10: 3)
Soporte:	Silicagel 60 G
Revelador:	UV , Amoníaco + luz UV y Tricloruro de aluminio
Rf:	Rf (Rev. Tricloruro de aluminio) = 0,70

Cuadro 6. Prueba de sistema de solventes para la identificación cromatográfica de alcaloides

Sistema de Solventes para alcaloides	Resultados
MeOH: NH ₃ (200:3)	Conforme
Acetato de etilo: MeOH: H ₂ O (100: 13,5: 10)	No conforme

Cuadro 7. Identificación cromatográfica de alcaloides (Fotos 27 a 29)

Método	Cromatografía en capa fina
Sistema de solventes	MeOH: NH ₃ (200:3)
Soporte	Silicagel 60 G
Revelador	Dragendorff
Rf	Placa 1: Rf (Rev. Dragendorff) = 0,51 / 0,57 / 0,65 / 0,72 Placa 2: Rf (Rev. Dragendorff) = 0,55 / 0,59 / 0,63 / 0,73 Placa 3: Aplicación en banda Rf (Rev. Dragendorff) = 0,55 / 0,58 / 0,65 / 0,72

4.1.2 Corroboración del efecto antiinflamatorio en el extracto seco (Fotos 30 a 36)

4.1.2.1 Corroboración del efecto antiinflamatorio en las diferentes dosis del extracto.

Tabla 3. Promedio del volumen del edema plantar obtenido en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio de las dosis de extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* en el tiempo

Grupo de evaluación	Tiempo (horas)	Promedio del volumen de edema plantar (mL)	Número de animales	Desviación estándar
Control	1	0,1400	6	0,032
	2	0,1767	6	0,053
	3	0,1600	6	0,028
	5	0,1467	6	0,005
	7	0,0717	6	0,005
D1 1,25 mg/0,1g	1	0,1067	6	0,012
	2	0,1233	6	0,005
	3	0,1017	6	0,004
	5	0,0750	6	0,013
D2 2,50 mg/0,1g	1	0,0933	6	0,038
	2	0,0817	6	0,040
	3	0,0433	6	0,018
	5	0,0317	6	0,007
D3 3,75 mg/0,1g	1	0,0933	6	0,025
	2	0,0800	6	0,028
	3	0,0467	6	0,015
	5	0,0217	6	0,014
D4 5,00 mg/0,1g	1	0,0920	5	0,027
	2	0,0700	5	0,031
	3	0,0400	5	0,021
	5	0,0200	5	0,015
D5 7,00 mg/0,1g	1	0,0850	6	0,035
	2	0,0433	6	0,028
	3	0,0300	6	0,020
	5	0,0067	6	0,008

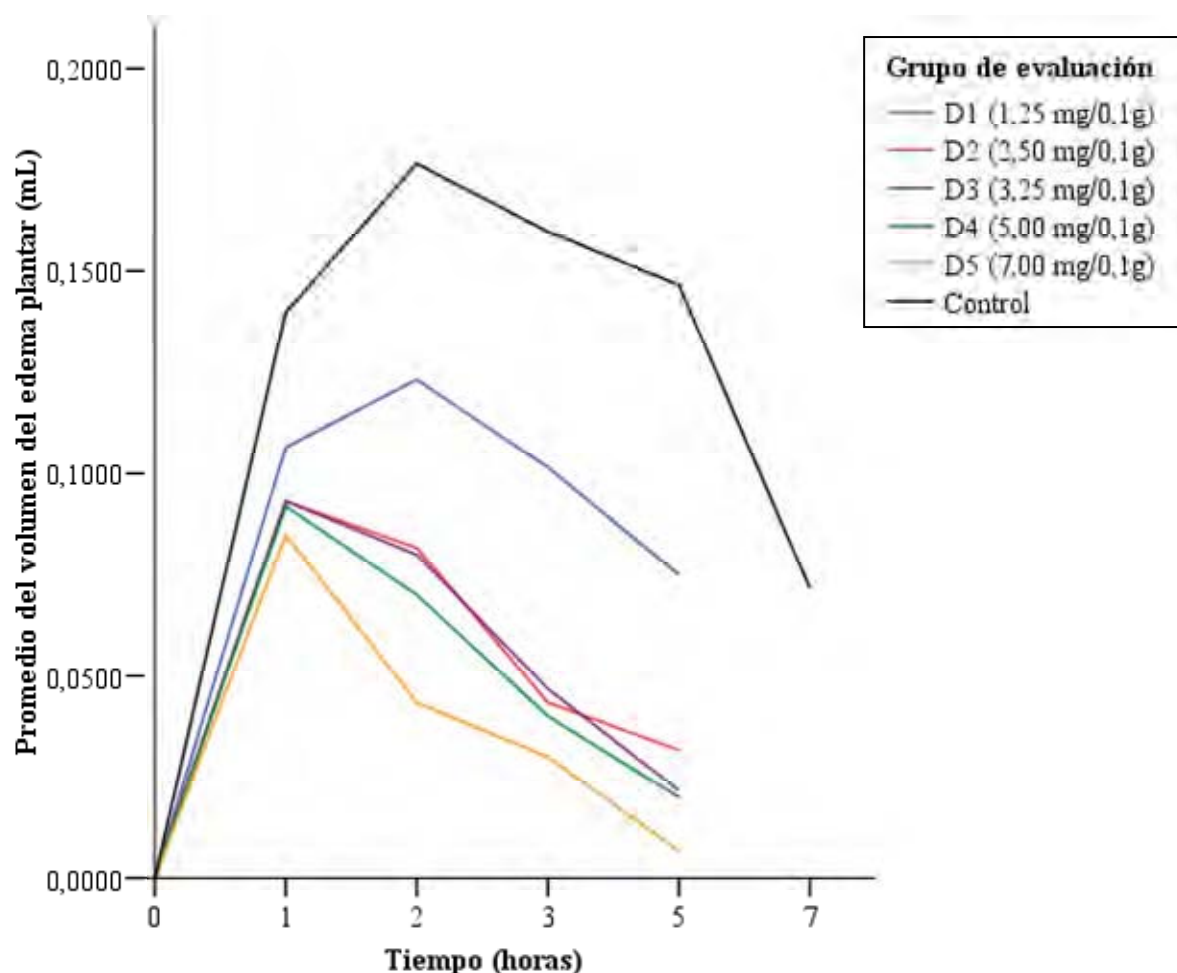


Grafico 1. Volumen del edema plantar obtenido en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio de las dosis de extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* en el tiempo

4.1.2.2 Análisis estadístico de la corroboración del efecto antiinflamatorio en las diferentes dosis del extracto de *B. latifolia*

Tabla 4. Valores promedio y dispersión del volumen del edema plantar obtenidos en las pruebas de corroboración del efecto antiinflamatorio de las diferentes dosis de extracto de *B. latifolia* a las 5 horas

Grupo de evaluación	*N	Promedio del volumen del edema plantar	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control	6	0,1467	0,00516	0,00211	0,1412	0,1521
1,25 mg/0,1g	6	0,0750	0,01378	0,00563	0,0605	0,0895
2,50 mg/0,1g	6	0,0317	0,00753	0,00307	0,0238	0,0396
3,75 mg/0,1g	6	0,0217	0,01472	0,00601	0,0062	0,0371
5,00 mg/0,1g	5	0,0200	0,01581	0,00707	0,0004	0,0396
7,00 mg/0,1g	6	0,0067	0,00816	0,00333	-0,0019	0,0152

*N = Número de animales

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas de los promedios de volumen del edema plantar obtenidos en las pruebas de corroboración del efecto antiinflamatorio de las diferentes dosis de extracto de *B. latifolia* a las 5 horas

Estadístico de Levene	*gl 1	*gl 2	*Sig.
1,639	5	29	0,181

*gl = grados de libertad / *Sig.= Significancia

De este análisis resulta que la significancia obtenida (0,181) es mayor a 0,05 por lo que se acepta la igualdad de las varianzas lo que indica que las poblaciones evaluadas tienen una distribución normal y varianzas homogéneas; por tanto para determinar las diferencias significativas de cada grupo se aplica la prueba de análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 6. Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de volumen del edema plantar obtenidos en las pruebas de corroboración del efecto antiinflamatorio de las diferentes dosis de extracto de *B. latifolia* a las 5 horas

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl*	Media cuadrática	Fexp*	P*	Fteo*
Inter-grupos	0,08237	5	0,01647	126,278	<0,05	4,504
Intra-grupos	0,00378	29	0,00013			
Total	0,08615	34				

*gl = grados de libertad / *Fexp = valor experimental / *p = grado de significancia / *Fteo= valor teórico

H1: Existe diferencia entre los grupos evaluados

H0: No existe diferencia entre los grupos evaluados

Si el valor $F_{exp} > F_{teo}$, la hipótesis nula se rechaza. Como se observa en el análisis en el valor $F_{exp} = 126,278$ obtenido es mayor que el $F_{teo} = 4,505$, por tanto existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos estudiados (diferentes dosificaciones) frente al control.

Para hallar las diferencias significativas entre las diferentes dosis se aplica la prueba de comparaciones múltiples, prueba de Tukey y para determinar la homogeneidad de los grupos se aplica la prueba de subconjunto homogéneo de Tukey.

Tabla 7. Prueba de Tukey de las diferencias significativas del volumen del edema plantar obtenidos en las pruebas de corroboración del efecto antiinflamatorio en las diferentes dosis de extracto de *B. latifolia* a las 5 horas

Variable dependiente: Volumen del edema plantar (mL)

	(I) Grupo de evaluación	(J) Grupo de evaluación	Diferencia de los promedios (I-J) del volumen del edema plantar	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	Control	1,25 mg/0,1g	0,07167(*)	0,00659	0,000	0,0516	0,0918
		2,50 mg/0,1g	0,11500(*)	0,00659	0,000	0,0949	0,1351
		3,75 mg/0,1g	0,12500(*)	0,00659	0,000	0,1049	0,1451
		5,00 mg/0,1g	0,12667(*)	0,00692	0,000	0,1056	0,1478
		7,00 mg/0,1g	0,14000(*)	0,00659	0,000	0,1199	0,1601
	D1 1,25 mg/0,1g	Control	-0,07167(*)	0,00659	0,000	-0,0918	-0,0516
		2,50 mg/0,1g	0,04333(*)	0,00659	0,000	0,0232	0,0634
		3,75 mg/0,1g	0,05333(*)	0,00659	0,000	0,0332	0,0734
		5,00 mg/0,1g	0,05500(*)	0,00692	0,000	0,0339	0,0761
		7,00 mg/0,1g	0,06833(*)	0,00659	0,000	0,0482	0,0884
	D2 2,50 mg/0,1g	Control	-0,11500(*)	0,00659	0,000	-0,1351	-0,0949
		1,25 mg/0,1g	-0,04333(*)	0,00659	0,000	-0,0634	-0,0232
		3,75 mg/0,1g	0,01000	0,00659	0,657	-0,0101	0,0301
		5,00 mg/0,1g	0,01167	0,00692	0,551	-0,0094	0,0328
		7,00 mg/0,1g	0,02500(*)	0,00659	0,008	0,0049	0,0451
	D3 3,75 mg/0,1g	Control	-0,12500(*)	0,00659	0,000	-0,1451	-0,1049
		1,25 mg/0,1g	-0,05333(*)	0,00659	0,000	-0,0734	-0,0332
		2,50 mg/0,1g	-0,01000	0,00659	0,657	-0,0301	0,0101
		5,00 mg/0,1g	0,00167	0,00692	1,000	-0,0194	0,0228
		7,00 mg/0,1g	0,01500	0,00659	0,237	-0,0051	0,0351
	D4 5,00 mg/0,1g	Control	-0,12667(*)	0,00692	0,000	-0,1478	-0,1056
		1,25 mg/0,1g	-0,05500(*)	0,00692	0,000	-0,0761	-0,0339
		2,50 mg/0,1g	-0,01167	0,00692	0,551	-0,0328	0,0094
		3,75 mg/0,1g	-0,00167	0,00692	1,000	-0,0228	0,0194
		7,00 mg/0,1g	0,01333	0,00692	0,406	-0,0078	0,0344
	D5 7,00 mg/0,1g	Control	-0,14000(*)	0,00659	0,000	-0,1601	-0,1199
		1,25 mg/0,1g	-0,06833(*)	0,00659	0,000	-0,0884	-0,0482
		2,50 mg/0,1g	-0,02500(*)	0,00659	0,008	-0,0451	-0,0049
		3,75 mg/0,1g	-0,01500	0,00659	0,237	-0,0351	0,0051
		5,00 mg/0,1g	-0,01333	0,00692	0,406	-0,0344	0,0078

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0,05.

Tabla 8. Prueba de Subconjuntos homogéneos de Tukey de la homogeneidad entre los grupos a las 5 horas

Variable dependiente: Volumen del edema plantar (mL)

Prueba estadística	Grupo de evaluación	N	Subconjunto para alfa = 0,05			
			1	2	3	4
HSD de Tukey(a,b)	D5=7,00 mg/0,1g	6	0,0067			
	D4=5,00 mg/0,1g	5	0,0200	0,0200		
	D3=3,75 mg/0,1g	6	0,0217	0,0217		
	D2=2,50 mg/0,1g	6		0,0317		
	D1=1,25 mg/0,1g	6			0,0750	
	Control	6				0,1467
	Sig.		0,252	0,518	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,806.

b Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Se forman 4 subconjuntos homogéneos que presentan diferencia significativa, los grupos D3 y D4, están presentes tanto en el subconjunto 1 como en el subconjunto 2, por tanto la diferencia significativa de los subconjuntos esta dado por los grupos: D5, D2, D1 y el grupo control.

4.1.2.3 Determinación de la dosis efectiva media (DE50) del extracto de *Baccharis latifolia*

Tabla 9. Valor promedio del porcentaje de inhibición del edema plantar ejercido por las diferentes dosis de extracto de *B. latifolia* en el tiempo

Grupo de evaluación	Tiempo (horas)	Promedio del porcentaje de inhibición del edema plantar (%)	*N	Desviación. típica
D1 1,25 mg/0,1g	1	23,80833	6	8,650823
	2	30,19333	6	2,922811
	3	36,45833	6	2,551552
	5	48,86167	6	9,398545
D2 2,50 mg/0,1g	1	33,33333	6	27,355956
	2	53,77667	6	23,037428
	3	72,91667	6	11,636867
	5	78,41167	6	5,130811
D3 3,75 mg/0,1g	1	33,33167	6	18,442630
	2	54,72000	6	16,008898
	3	70,83333	6	9,409658
	5	85,22833	6	10,034013
D4 5,00 mg/0,1g	1	34,28800	5	19,821345
	2	60,38000	5	17,898492
	3	75,00000	5	13,258252
	5	86,36400	5	10,778624
D5 7,00 mg/0,1g	1	39,28500	6	25,050928
	2	75,47333	6	16,273525
	3	81,25000	6	13,110111
	5	95,45333	6	5,568507

*N= Número de animales

Tabla 10. Determinación de la dosis efectiva media (DE 50) por regresión lineal

Dosis efectiva 50					
Grupo de evaluación	D1	D2	D3	D4	D5
Porcentaje de inhibición del edema plantar a las 5 horas (%)	48,86167	78,41167	85,22833	86,364	95,45333
Dosis (mg de extracto aplicado)	1,25	2,50	3,75	5,00	7,00
Log. de la dosis	0,09691	0,39794	0,5740313	0,69897	0,845098

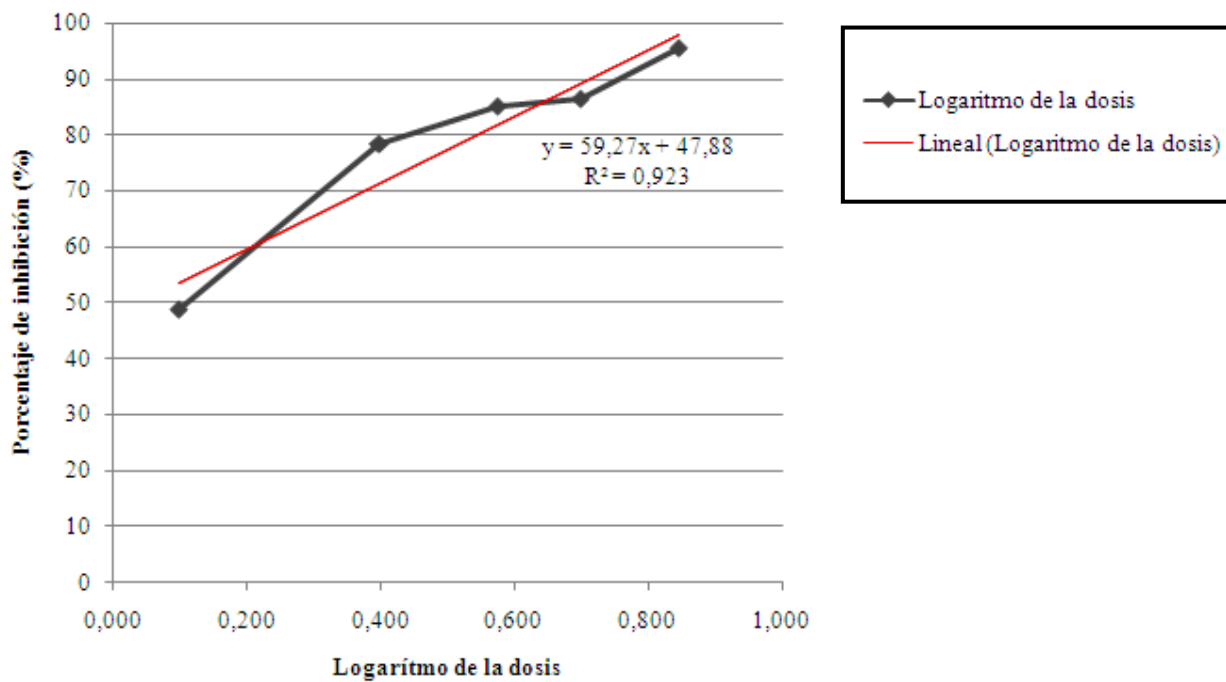


Grafico 2. Determinación de la dosis efectiva media (DE50)

Ecuación de la recta

$$y = 59,27x + 47,88$$

Cálculo de dosis efectiva media (DE 50)

Y	X	
50% de inhibición	Logaritmo de la dosis	0,0358
	Dosis (mg de extracto)	1,086

$$DE\ 50 = 1,086\ mg$$

4.1.3 Obtención del activo

4.1.3.1 Ensayos de concentración del extracto hidroalcohólico

Se realizaron los siguientes ensayos para determinar la concentración de extracto hidroalcohólico de acuerdo a los las diferentes cantidades que podrían ser incorporados en le producto terminado.

Cuadro 8. Determinación de la concentración del extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* a emplear en el producto terminado

Cantidad de extracto hidroalcohólico en el producto terminado (%)	Concentración del extracto hidroalcohólico	Resultado
10%	25%	Se observa residuo de extracto seco no disuelto
30%	8,33%	Se observa residuo de extracto seco no disuelto
40%	6,25%	Completa disolución
50%	5%	Completa disolución

4.1.3.2 Preparación del activo (Extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* al 6,25%)

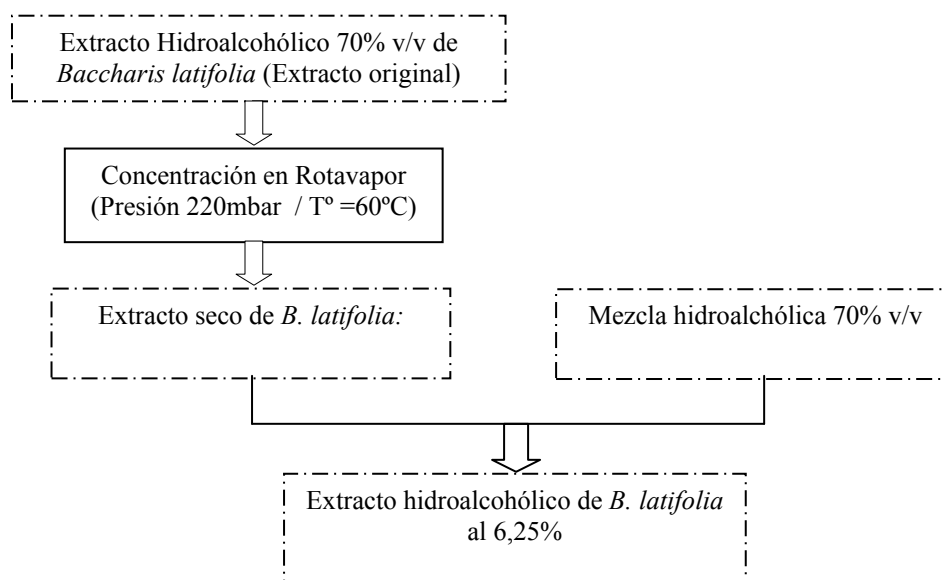


Diagrama 5. Obtención del activo (Extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* al 6,25%)

4.1.4 Análisis fisicoquímico del activo (Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 6,25%)

Cuadro 9. Protocolo de análisis del activo: Extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* al 6,25% (Foto37)

Producto	Extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> al 6,25%
-----------------	---

Parámetro	Especificación	Resultado
Aspecto	Líquido fluido de color verde oscuro y olor característico.	Conforme
Densidad	0,86 – 0,90g/mL	0,881g/mL
pH	6,4 – 6,8	6,54
Sólidos totales	1,1 – 1,3%	1,2%
Porcentaje de alcohol	70% v/v	70% v/v
Solubilidad	Muy soluble en etanol y metanol Insoluble en n-hexano	Conforme
Identificación por CCF de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos	Positivo	Conforme
Identificación por CCF de flavonoides	Positivo	Conforme
Identificación por CCF de alcaloides	Positivo	Conforme

4.2 Diseño de la formulación

4.2.1 Análisis FODA de forma farmacéutica

Para la elección de la forma farmacéutica adecuada se evaluaron las características de diferentes preparaciones semisólidas con relación a la factibilidad de su fabricación, el aspecto del producto final, estabilidad y seguridad, costo y otros. Se evaluaron seis formas farmacéuticas diferentes: Crema O/A, crema A/O, gel, crema-gel, pasta y ungüento. (Cuadro 10)

4.2.2 Análisis FODA de excipientes

Para la selección de excipientes se evalúan los principales excipientes que pueden ser empleados en una forma farmacéutica semisólida tipo seleccionada. Estos excipientes incluyen vehículos para la fase oleosa, emulsificantes, gelificantes y otros excipientes como conservadores y humectantes. Los excipientes son evaluados de acuerdo a las propiedades y características de su naturaleza, siendo la estabilidad de los mismos con otros excipientes un aspecto importante para la elección de los excipientes a emplear posteriormente en las preparaciones de ensayo. (Cuadro 11 al Cuadro 14)

Cuadro 10. Análisis FODA de la forma farmacéutica: (28 29, 30, 32)

ITEMS	Crema O/A	Crema A/O	Gel	Crema-gel	Pasta	Base hidrocarbonada
Factibilidad de Fabricación	Pueden incorporar cantidades considerables de agua (80 a 90%) Requiere el empleo de productos auxiliares (antioxidantes, humectantes, conservadores). Puede requerir de calor para la preparación Requiere agitación lenta y energética	No incorpora grandes cantidades de agua. Puede sufrir posible inversión de fases en caso la fase acuosa sea muy elevada Requiere el empleo de productos auxiliares (antioxidantes y conservadores). Requiere calor para la preparación y agitación constante	Buen vehículo para activos hidrosolubles. No necesita calor. Activos no solubles tiende a perder claridad y suavidad. Pueden contener agentes auxiliares (conservadores, antioxidantes y estabilizadores.) Deben incorporar agentes conservantes especialmente para excipientes de origen natural.	Buen vehículo para activos hidrosolubles. No necesita calor. Usado para activos no solubles. Pueden contener agentes auxiliares (conservadores, antioxidantes y estabilizadores). Deben incorporar agentes conservantes especialmente para excipientes de origen natural.	Polvos insolubles en concentraciones de 20% a 60% disperso en bases hidrosolubles o liposolubles. Incluye parafina líquida, glicerol, mucílagos, agentes emulsificantes y aceites. No acepta mucha concentración de líquido.	No contienen agua en su formula básica pero puede incorporar poca agua para obtener una emulsión w/o. Generalmente anhidro. Se puede incrementar la consistencia aumentado ceras, pero es necesario el uso de calor. Requieren el uso de antioxidantes y conservadores.
Aspecto	Fácilmente lavable. Aceptable plasticidad y extensibilidad. Buena consistencia. Buena adherencia a la piel. Tienden a desvanecerse una vez aplicado. La piel queda con aspecto mate. Bajo poder emoliente	Consistencia variable Cremas grasas Dejan sensación untuosa al tacto Dejan piel grasa brillante Poder oclusivo Ligero efecto refrescante	No grasos Suave y elegante Efecto refrescante Transparente o translúcido Fácilmente lavables	No graso Suave Efecto refrescante Ligeramente opalescente u opaco. Fácilmente lavable Emoliente Ligeramente oclusivos	Absorbentes Propiedades dilatantes. Flujo tixotrópico y pseudoplástico. Poca extensibilidad. Sensación de polvo. Buen poder oclusivo	Suaves e inodoros Oleosos y untuosos al tacto No lavable con agua Oclusivos Aceptable adherencia a la piel y extensibilidad
Estabilidad y seguridad	Favorece el crecimiento de microorganismos. Presentan incompatibilidad con muchos componentes Puede tener problemas de cremado o coalescencia por ser muy inestables	Favorece el crecimiento de Microorganismos Presentan incompatibilidad con muchos componentes Puede tener problemas de cremado o coalescencia por ser muy inestables	Favorece el crecimiento de microorganismos. Presentan incompatibilidad con muchos componentes	Favorece el crecimiento de microorganismos. Presentan incompatibilidad con muchos componentes	Estables	Inertes y estables. No favorecen el crecimiento de mohos Idealmente estos no producen irritación ni sensibilización de la piel. Farmacológicamente inerte. Pueden producir alergias
Costo	Uso de calor y prolongado tiempo de agitación eleva el costo de producción	Uso de calor y prolongado tiempo de agitación eleva el costo de producción.				Uso de calor eleva el costo de producción
Otros	Proporcionan una buena liberación de medicamentos		Proveen una liberación mas rápida del activo que las cremas y las pomadas	Proveen una liberación mas rápida del activo que las cremas y las pomadas		Pomadas tienen la capacidad de absorber agua adicional

Cuadro 11. Análisis FODA de los excipientes: Vehículos para la fase oleosa ⁽³⁶⁾

ITEMS	Aceite mineral (Parafina líquida)	Ácido Esteárico	Vaselina (Petrolato)	Lanolina
Aspecto	Líquido transparente, incoloro y viscoso. No tiene sabor ni color.	Sólido blanco o crema Presenta un ligero olor característico	No es absorbido por la piel Sólido untuoso de color amarillo pálido e inodoro	Amarillo untuoso Característico olor
Propiedades	Propiedades emolientes, insoluble en alcohol, glicerina y agua	Casi insoluble en agua, y ligeramente soluble en alcohol. Punto de fusión: 59 a 64 °C	Insoluble en alcohol, glicerina y agua. Es más suave que la parafina. Punto de fusión: 38 a 60 °C	Soluble en alcohol (95%), insoluble en agua
Estabilidad	Se oxida lentamente al ser expuesto al calor o la luz. Incompatible con agentes oxidantes	Estable en forma sólida, pero tiende a oxidarse a la luz y el calor Incompatible con hidróxidos	Es estable, pero puede contener impurezas que se oxidan al ser expuesto a la luz No presenta incompatibilidades	Tiende a oxidarse con el tiempo. Expuesto al calor por un periodo largo se oscurece y desarrolla un olor rancio
Seguridad	Asociado con pocos casos de reacciones alérgicas.	Puede causar irritación particularmente en personas sensibles	Se han tenido poco reportes de reacciones irritantes	Generalmente no tóxico pero puede ser irritante y causar reacciones de hipersensibilidad en ciertas personas
Otros	Emoliente	Agente emulgente	Emoliente	Agente emulgente

Cuadro 12. Análisis FODA de los excipientes: Emulsificantes ⁽³²⁾

ITEMS	Emulsificantes Aniónicos	Emulsificantes Catiónicos	Emulsificantes No Iónicos
Aspecto	Ajustan el sistema emulsionado a un pH de 4,5 a 6,5 Formación de excesiva espuma durante la disolución.	Usualmente usado en combinación con alcoholes grasos (alcohol cetoestearílico). Tiene propiedades antimicrobianas. Se necesita calor para incorporar el emulsificante.	Usado en emulsiones A/O y O/A Tiene propiedades hidrofílicas es determinado por la cantidad de grupos oxietileno presentes. Reduce la actividad de los parabenos
Estabilidad	Son más estables en medios ácidos. Incompatibles con cationes.	Incompatible con aniones Estables a un pH de 3,0 a 7,0	Compatible con electrolitos y diferentes sustancias. Estable
Seguridad	Pueden ser irritantes aplicados a la piel	Puede provocar irritación al ser aplicado sobre la piel	No irritante
Ejemplos	Lauril sulfato de sodio Cetoestearil sulfato	Alcohol cetoestearílico (p.f: 43 a 53°C), soluble en vaselina líquida entre 40 a 60°C Cetrimide®, alcohol cetílico (p.f: 45 a 50°C)	Tween® (polisorbatos), ésteres de glicerol, alcohol polivinílico

Cuadro 13. Análisis FODA de los excipientes: Gelificantes ⁽³⁶⁾

ITEMS	Aluminio Magnesio Silicato	Carbomer® 934 (Polímero de Carboxivinil)	Carboximetil celulosa	“Sepigel® 305” (Polímero de poliacrilamida)	Aerosil® (Dióxido de silicio coloidal)
Aspecto	Polvo micronizado fino, de color blanco o crema libre de olor	Generalmente transparente y translúcido. Se forma gel cuando se neutraliza con una base	Gel no iónico, transparente, translúcido y viscoso	Gel transparente, translúcido y brillante con consistencia cremosa	Polvo submicroscópico amorfo ligero de color blanco e inodoro. Muy poco denso
Concentración	Usado a concentraciones mayores de 10% forma gel tixotrópico	Bajas concentraciones para producir geles 0,5% a 2%	Forman geles de flujo pseudoplástico a concentraciones de 2 a 6%	Forma geles a bajas concentraciones 0,1 a 3%	Forma geles en concentraciones de 2 a 10%
Estabilidad	Muy Estable en un amplio rango de pH No toxico , no irritante	Formación de burbujas pueden oxidar los componentes en presencia de luz. Requiere un antioxidante, un agente quelante y un agente antimicrobiano	La exposición al calor disminuye la viscosidad.	Estable a altas temperaturas y a un amplio rango de pH	Higroscópico, absorbe grandes cantidades de agua
Solubilidad	Insoluble en agua y alcohol. Forma dispersiones coloidales. Insoluble en solventes orgánicos	Puede formar gel con etanol, glicerol y otros solventes orgánicos	Soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos		Insoluble en agua, forma dispersiones coloidales. Soluble en soluciones alcalinas
Viscosidad	La viscosidad es afectada por el calor, electrolitos.	La viscosidad se reduce a pH menores de 3 y mayores de 12.	Depende de la concentración. La viscosidad aumenta a pH elevados. El incremento de la temperatura disminuye la viscosidad	La viscosidad se mantiene a altas temperatura	La viscosidad depende de la polaridad del líquido. Los líquidos polares requieren de mayor concentración.
Incompatibilidad	Presenta pocas incompatibilidades: con ácidos fuertes.		Incompatible con soluciones fuertemente ácidas y sales solubles de hierro y otros metales.		No presenta incompatibilidades

Cuadro 14. Análisis FODA de los excipientes: Otros excipientes ⁽³⁶⁾

ITEMS	Glicerina	Propilenglicol	Butilparabeno	Metilparabeno	Propilparabeno
Categoría funcional	Humectante	Humectante	Conservador antimicrobiano	Conservador antimicrobiano	Conservador antimicrobiano
Aspecto	Líquido traslúcido, incoloro, inodoro, viscoso e higroscópico. Es aproximadamente 0,6 veces tan dulce como la sucrosa.	Líquido traslúcido, incoloro, viscoso y prácticamente inodoro, con un sabor dulce y algo amargo similar al de la glicerina.	Cristales incoloros o polvo blanco cristalino, inodoro o casi inodoro e insípido.	Cristal incoloro o polvo blanco cristalino. Es inodoro o casi inodoro y tiene un suave sabor picante.	Polvo blanco, cristalino, inodoro e insípido.
Concentración	Mayor a 30%	Aprox. 15%	0,02 a 0,04%	0,02 a 0,3%	0,01 a 0,6%; 0,02% en combinación con metilparabeno (0,18%)
Estabilidad	Es higroscópico. Se oxida a altas temperaturas. Es estable en mezclas con agua, etanol y propilenglicol. Puede cristalizar al ser almacenado a bajas temperaturas.	Se oxida a altas temperaturas. Es estable en mezclas con etanol (95%), glicerina o agua.	La actividad se reduce significativamente en presencia de emulsificantes no iónicos.	La actividad se reduce significativamente en presencia de emulsificantes no iónicos, pero el propilenglicol potencia su actividad y reduce la interacción entre ambos.	La actividad se reduce significativamente en presencia de emulsificantes no iónicos.
Solubilidad	Es miscible con etanol (95%), metanol y agua. No es soluble en aceites, benceno ni cloroformo.	Es miscible con etanol (95%), glicerina y agua. No es miscible con aceite mineral.	Prácticamente insoluble en agua fría, regularmente soluble en agua a 80°C, la solubilidad en etanol es de 1 en 5, en etanol a 95°C y propilenglicol es 1 en 1.	Prácticamente insoluble en aceite mineral y agua fría, regularmente soluble en agua a 80°C, solubilidad en etanol es de 1 en 2, en etanol a 95% es de 1 en 3.	Prácticamente insoluble en agua, poco soluble en agua a 80°C, soluble en etanol 1 en 1,1, propilenglicol 1 en 3,9; en glicerina 1 en 250.
Incompatibilidad	Agentes oxidantes como clorato de potasio o permanganato de potasio. Trazas de hierro en presencia de fenoles, taninos.	Reactivos oxidantes como el permanganato de potasio.	Es incompatible con emulsificantes no iónicos, hierro, álcalis débiles y ácidos fuertes.	Es incompatible con emulsificantes no iónicos, hierro, álcalis débiles y ácidos fuertes.	Es incompatible con emulsificantes no iónicos, hierro, álcalis débiles y ácidos fuertes.
Otros	Es utilizada principalmente por sus propiedades humectantes y emolientes.	Es mejor solvente que la glicerina y disuelve una amplia variedad de compuestos. Produce muy poca irritación a nivel local, aunque es mayor a la producida por la glicerina.	Presenta su actividad entre pH 4 a 8, esta actividad se reduce al incrementar el pH. Aunque tiene un amplio espectro, es más efectivo contra levaduras y hongos que frente a bacterias.	Presenta su actividad entre pH 4 a 8, esta actividad se reduce al incrementar el pH. Aunque tiene un amplio espectro, es más efectivo contra levaduras y hongos que frente a bacterias.	Presenta su actividad entre pH 4 a 8, esta actividad se reduce al incrementar el pH. Aunque tiene un amplio espectro, es más efectivo contra levaduras y hongos que frente a bacterias.

4.2.3 Formulación y ensayo de fórmulas

4.2.3.1 Ensayo de forma farmacéutica de uso tópico

GEL

Formulación 1: Gel de carboximetil celulosa 5%

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Carboximetil celulosa (CMC)	5,00	%
Propilenglicol	20,00	%
Cremophor® Rh40 (polioxietilentalquil éter)	1,10	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Etanol 96°	10,00	%
Etanol 70°	23,70	%
Total	100,00	%

RESULTADO: No conforme: gel muy espeso, color verde oscuro opalescente. No tiene buena extensibilidad. Dificil aplicación. Luego de la aplicación deja un residuo en forma de grumos

Formulación 2: Gel de carboximetil celulosa 2%

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Carboximetil celulosa (CMC)	2,00	%
Propilenglicol	20,00	%
Cremophor® Rh40 (polioxietilentalquil éter)	1,10	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Etanol 96°	10,00	%
Etanol 70°	26,70	%
Total	100,00	%

RESULTADO: No conforme: fácil aplicación, color verde translúcido. En la aplicación no deja residuo. Olor característico. Buena consistencia, con el tiempo tiende a secarse y a perder fluidez

Formulación 3: Gel de Carbomer® 0.5%

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Carbomer® 934	0,50	%
Propilenglicol	5,00	%
Cremophor® Rh40 (polioxietilentalquil éter)	1,10	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Etanol 96°	10,00	%
Etanol 70°	43,10	%
Trietanolamina	0,10	%
Total	100,00	%

RESULTADO: No conforme. No se formó el gel

Formulación 4: Gel de Carbomer® 1%

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Carbomer®934	1,00	%
Propilenglicol	5,00	%
Cremophor® Rh40 (polioxietilentalquil éter)	1,10	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Etanol 96°	10,00	%
Agua	42,60	%
Trietanolamina	0,10	%
Total	100,00	%
RESULTADO: No conforme. No se formó gel		

Formulación 5: Gel de dióxido de silicio coloidal (Aerosil®)

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Aerosil: Dióxido de silicio Coloidal	6,00	%
Propilenglicol	20,00	%
Cremophor® Rh40 (polioxietilentalquil éter)	1,10	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Etanol 96°	10,00	%
Etanol 70°	22,70	%
Total	100,00	%
RESULTADO: No conforme (mancha). Se formó un gel opalescente, color marrón amarillento. Al ser aplicado deja mancha blanquecina		

CREMA O/A**Formulación 6: Crema O/A**

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Alcohol cetosteárilico	7,00	%
Cremophor® A6	1,50	%
Cremophor® A25	1,50	%
Parafina líquida	12,00	%
Propilparabeno	0,02	%
Metilparabeno	0,18	%
Agua	29,80	%
Propilenglicol	8,00	%
Total	100,00	%
RESULTADO: No conforme. Crema verdosa, buena consistencia, fácil aplicación y eliminación. Poca estabilidad con el tiempo se separan las fases.		

CREMA-GEL

Formulación 7: Sepigel® 305+ Fase oleosa

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Propilenglicol	5,00	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Sepigel® 305	4,00	%
Vaselina	10,00	%
Agua	40,80	%
Total	100,00	%

RESULTADO: Conforme. Gel verde oscuro, presenta buena fluidez, de fácil aplicación, buena extensibilidad pero ligeramente fluido.

Formulación 8: Simugel® + Fase oleosa

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%
Propilenglicol	5,00	%
Metilparabeno	0,18	%
Propilparabeno	0,02	%
Simugel® CETCO	5,00	%
Vaselina	10,00	%
Agua	39,80	%
Total	100,00	%

RESULTADO: Conforme. Gel mostaza verdoso claro, presenta buena fluidez, de fácil aplicación, buena extensibilidad pero al aplicar deja una sensación grasosa.

4.2.3.2 Ensayo de excipientes para la forma farmacéutica crema-gel

Formulación 9: Simugel® CETCO

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Propilenglicol	5,00	%	(1) Mezcla extracto + Parabenos + Propilenglicol (2) Fundir alcohol cetílico + vaselina (3) Adicionar agua a la mezcla (2) (4) Adicionar Mezclar (1) en (3) (3) Adicionar Mezcla (4) en Simugel poco a poco
Metilparabeno	0,18	%	
Propilparabeno	0,02	%	
Alcohol cetílico	5,00	%	
Vaselina	15,00	%	
Simugel® CETCO	3,00	%	
Agua	31,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Crema gel de consistencia liquida, color mostaza no homogéneo y se separa la fase oleosa.			

Formulación 10: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Propilenglicol	15,00	%	(1) Mezcla Extracto + Parabenos + Propilenglicol (2) Se añade al Sepigel el preparado (1) y se adiciona agua (3) Aparte fundir Vaselina + alcohol cetílico (4) Mezcla: (1) + (2) + (3)
Metilparabeno	0,18	%	
Propilparabeno	0,02	%	
Alcohol cetílico	5,00	%	
Vaselina liquida	15,00	%	
Sepigel® 305	1,00	%	
Agua	23,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme, no forma emulsión.			

Formulación 11: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Propilenglicol	15,00	%	(1) Mezcla Extracto + Parabenos + Propilenglicol (2) Se añade al Sepigel el preparado (1) y se adiciona agua (3) Aparte fundir Vaselina + alcohol cetílico (4) Mezcla: (1) + (2) + (3)
Metilparabeno	0,18	%	
Propilparabeno	0,02	%	
Alcohol cetílico	5,00	%	
Vaselina liquida	15,00	%	
Sepigel® 305	2,00	%	
Agua	22,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme, no forma emulsión.			

Formulación 12: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Metilparabeno	0,18	%	(1) Mezcla Extracto + Parabenos
Propilparabeno	0,02	%	(2) Mezcla Sepigel + (1)
Alcohol cetílico	5,00	%	(3) Aparte fundir vaselina + alcohol cetílico
Vaselina liquida	10,00	%	(4) Mezcla: (3) + (2)
Sepigel® 305	3,00	%	(5) A la mezcla (4) adicionar agua
Agua	41,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Crema-gel de color verde cremoso (blanquecino), ligeramente fluido, de fácil aplicación.			

Formulación 13: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método
Metilparabeno	0,18	%	(1) Mezcla Extracto + Parabenos
Propilparabeno	0,02	%	(2) Mezcla Sepigel + (1) + agua
Vaselina liquida	15,00	%	(3) Mezcla (2) se adiciona vaselina
Sepigel® 305	5,00	%	
Agua	39,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Aparente separación de la vaselina, color verde oscuro, consistencia ligeramente fluida.			

Formulación 14: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método
Propilenglicol	10,00	%	(1) Mezcla de Parabenos + Extracto
Metilparabeno	0,18	%	(2) Formación de gel: Sepigel + agua
Propilparabeno	0,02	%	(3) Fundir Alcohol Cetílico + Vaselina
Alcohol cetílico	5,00	%	(4) Mezcla (1) en (2)
Vaselina liquida	10,00	%	(5) Mezcla (3) en (4)
Sepigel® 305	3,00	%	(6) Adiciona propilenglicol en la mezcla (5)
Agua	31,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Crema-gel color verde cremoso (blanquecino), aparente tendencia de separación.			

Formulación 15: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00 %	Método
Metilparabeno	0,18 %	(1) Mezcla de Parabenos + Extracto
Propilparabeno	0,02 %	(2) Formación de gel: Sepigel + agua
Alcohol cetílico	5,00 %	(3) Fundir Alcohol Cetílico
Sepigel® 305	3,00 %	(4) Mezcla (1) en (2)
Agua	51,80 %	(5) Mezcla (3) en (4)
Total	100,00 %	
RESULTADO: No conforme, color verde opaco cremoso. Se presentan grumos formados por el alcohol cetílico solidificado.		

Formulación 16: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00 %	Método:
Propilenglicol	5,00 %	(1) Mezcla extracto + Parabenos +
Metilparabeno	0,18 %	Propilenglicol
Propilparabeno	0,02 %	(2) Fundir alcohol cetílico + vaselina
Alcohol cetílico	5,00 %	(3) Adicionar agua a la mezcla (2) (4)
Vaselina	15,00 %	Mezclar Sepigel + mezcla (3)
Sepigel® 305	3,00 %	(4) Mezclar poco a poco (1) en (4)
Agua	31,80 %	
Total	100,00 %	
RESULTADO: No conforme. Crema-gel inestable, tiende a exudar la parte oleosa.		

Formulación 17: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00 %	Método:
Propilenglicol	5,00 %	(1) Formar gel: Sepigel + agua
Metilparabeno	0,18 %	(2) Mezclar en un mortero (1) +
Propilparabeno	0,02 %	vaselina sólida
Vaselina sólida	20,00 %	(3) Aparte mezclar el extracto +
Sepigel® 305	3,00 %	Propilenglicol + Parabenos
Agua	31,80 %	(4) Adicionar (3) en (2) poco a poco
Total	100,00 %	
RESULTADO: No conforme. Crema no homogénea, verde oscuro brillante, muy fluida y tiene a separarse		

Formulación 18: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Propilenglicol	5,00	%	(1) Fundir alcohol cetílico + vaselina + agua
Metilparabeno	0,18	%	(2) Mezclar Sepigel + mezcla (1)
Propilparabeno	0,02	%	(3) Aparte mezclar extracto + Propilenglicol + Parabenos
Alcohol cetílico	5,00	%	(4) Adicionar (3) en (2) poco a poco
Vaselina sólida	15,00	%	
Sepigel® 305	3,00	%	
Agua	31,80	%	
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Crema verde claro, ligeramente fluida			

Formulación 19: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Propilenglicol	5,00	%	(1) Fundir Cera lanette
Metilparabeno	0,18	%	(2) Adicionar agua caliente a (1) con agitación
Propilparabeno	0,02	%	(3) Seguir con agitación hasta enfriar y obtener una crema
Cera lanette	6,00	%	(4) Adicionar a (3) Sepigel con agitación
Sepigel® 305	3,00	%	(5) Aparte mezclar Extracto + Parabenos + Propilenglicol
Agua	45,80	%	(6) Incorporar (5) en (4) con agitación.
Total	100,00	%	
RESULTADO: No conforme. Crema-gel de color verde claro, cremoso. Consistencia ligera, color uniforme. Brillante.			

Formulación 20: Sepigel® 305

Extracto hidroalcohólico de <i>B. latifolia</i> al 6,25%	40,00	%	Método:
Glicerina	5,00	%	(1) Mezcla extracto + Parabenos
Metilparabeno	0,18	%	(2) Preparar el gel: Sepigel + $\frac{3}{4}$ agua
Propilparabeno	0,02	%	(3) Mezclar Glicerina + $\frac{1}{4}$ Agua
Parafina Líquida	10,00	%	(4) Adicionar (1) en (2)
Sepigel® 305	5,00	%	(5) Incorporar poco a poco con agitación (3) en (4)
Agua	39,80	%	(6) Adicionar Parafina en (5) con agitación
Total	100,00	%	
RESULTADO: Conforme. Gel brillante verde oscuro, gel consistente, de fácil aplicación y eliminación. Tiene buena extensibilidad y se absorbe fácilmente. Al aplicar tiene un efecto refrescante y emoliente. Presenta olor característico.			

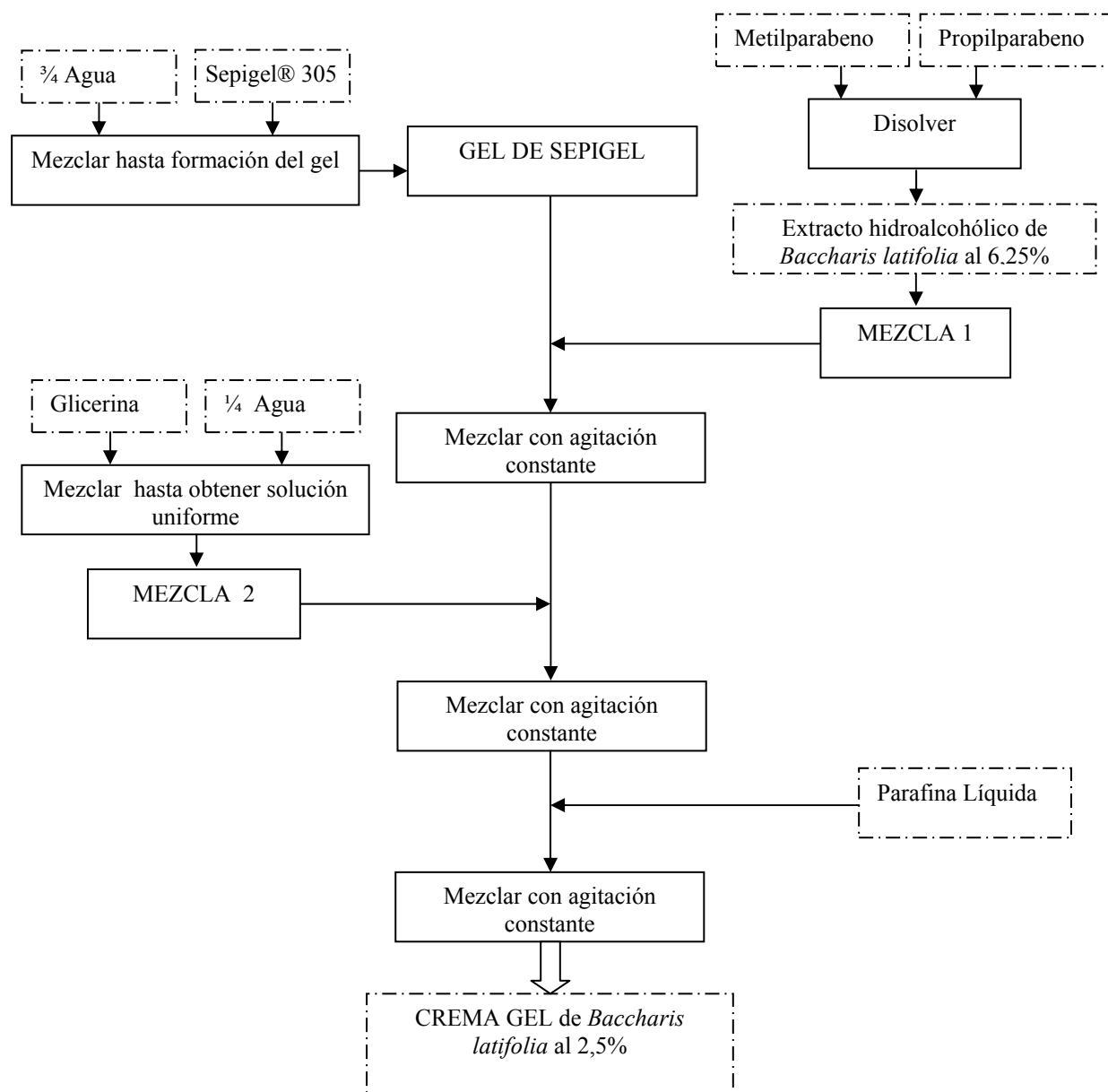


Diagrama 6. Proceso de preparación del producto terminado
Formulación 20 – Crema-gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%

4.2.4 Análisis fisicoquímico del producto terminado

Cuadro 15. Análisis físico del producto terminado (Fotos 38 a 41)

Parámetro	Resultado
Forma farmacéutica	Crema-gel
Aspecto	Semisólido homogéneo y uniforme
Color	Verde Oscuro
Olor	Característico
pH (tal cual)	5,79

Cuadro 16. Identificación cromatográfica de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos del producto terminado (Fotos 42 a 44)

Método	Cromatografía de capa fina (CCF)
Sistema de solventes:	Benceno: Acetato de etilo (2: 1)
Revelador:	Liebermann – Burchard y H ₂ SO ₄ al 50%
Rf (extracto):	Rf (Rev. Liebermann – Burchard) = 0,910 Rf (Rev. Ácido sulfúrico 50%) = 0,910
Rf (producto):	Rf (Rev. Liebermann – Burchard) = 0,913 Rf (Rev. Ácido sulfúrico 50%) = 0,913
Rf (placebo):	Rf (Rev. Liebermann – Burchard) = no se aprecia mancha característica Rf (Rev. Ácido sulfúrico 50%) = no se aprecia mancha característica

Cuadro 17. Protocolo de análisis del producto terminado

Producto	Crema-gel a base del extracto hidroalcohólico de <i>Baccharis latifolia</i> al 2,5%	
Parámetro	Especificación	Resultado
Forma farmacéutica	Crema-gel	Conforme
Aspecto	Semisólido homogéneo y uniforme	Conforme
Color	Verde Oscuro	Conforme
Olor	Característico	Conforme
pH (tal cual)	5,5 – 7,0	5,79
Empaque primario	Tubo de aluminio colapsible	Conforme
Empaque secundario	Caja de cartón	Conforme
Identificación por CCF de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos	Positivo	Conforme

4.2.5 Comprobación del efecto antiinflamatorio en el producto terminado

4.2.5.1 Comparación del efecto antiinflamatorio en la formulación de crema-gel de *B. latifolia* y extracto de *B. latifolia*. (Foto 45)

Tabla 11. Promedio del volumen de edema plantar obtenidos en la prueba de comprobación del efecto antiinflamatorio de los grupos evaluados en el tiempo

Grupo de evaluación	Tiempo (horas)	Media	*N	Desviación típica
Extracto	1	0,0917	6	0,00983
	2	0,0817	6	0,01169
	3	0,0617	6	0,00753
	5	0,0350	6	0,00548
	7	0,0150	6	0,00548
Formulación	1	0,1067	6	0,00516
	2	0,0833	6	0,00816
	3	0,0467	6	0,00816
	5	0,0250	6	0,00548
	7	0,0083	6	0,00408
Placebo de extracto	1	0,1167	6	0,01633
	2	0,1467	6	0,02066
	3	0,1683	6	0,01329
	5	0,1383	6	0,01941
	7	0,0917	6	0,02787
Placebo de Formulación	1	0,1317	6	0,03371
	2	0,1550	6	0,03987
	3	0,1400	6	0,05367
	5	0,1067	6	0,02503
	7	0,0617	6	0,02041

*N = Número de animales

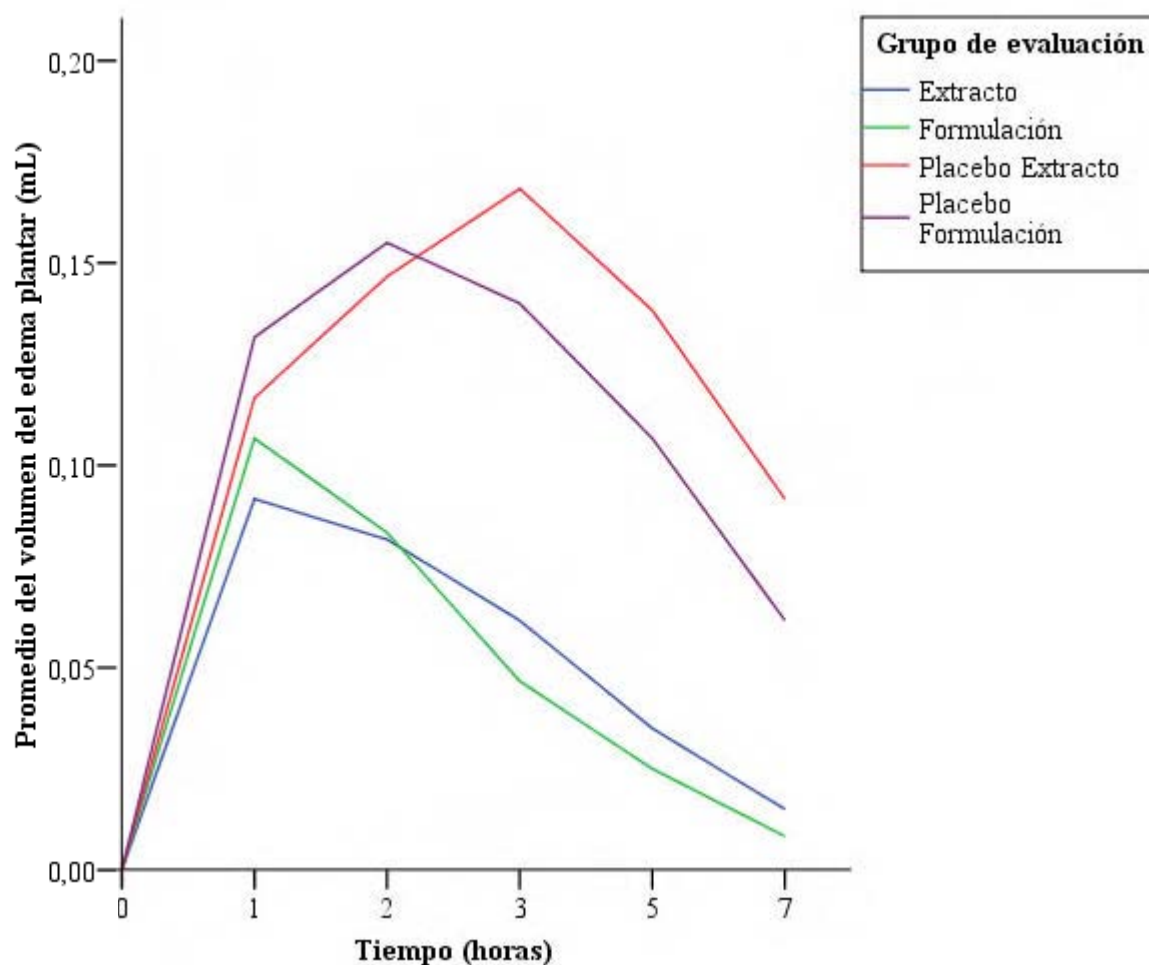


Grafico 3. Volumen de edema plantar obtenidos en la prueba de la comprobación del efecto antiinflamatorio de los grupos evaluados en el tiempo

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de edema plantar del extracto de *B. latifolia* vs. la formulación de crema-gel de *B. latifolia* en el tiempo

Grupo de evaluación	Tiempo (horas)	Promedio del porcentaje de inhibición del edema (%)	*N	Desviación típica.
Extracto	1	21,42883	6	8,427414
	2	44,31833	6	7,971006
	3	63,36617	6	4,471780
	5	74,69850	6	3,959486
	7	83,63650	6	5,975105
Formulación	1	18,98767	6	3,922041
	2	46,23650	6	5,267628
	3	66,66700	6	5,832235
	5	76,56250	6	5,134899

	7	86,48667	6	6,620154
--	---	----------	---	----------

*N = Número de animales

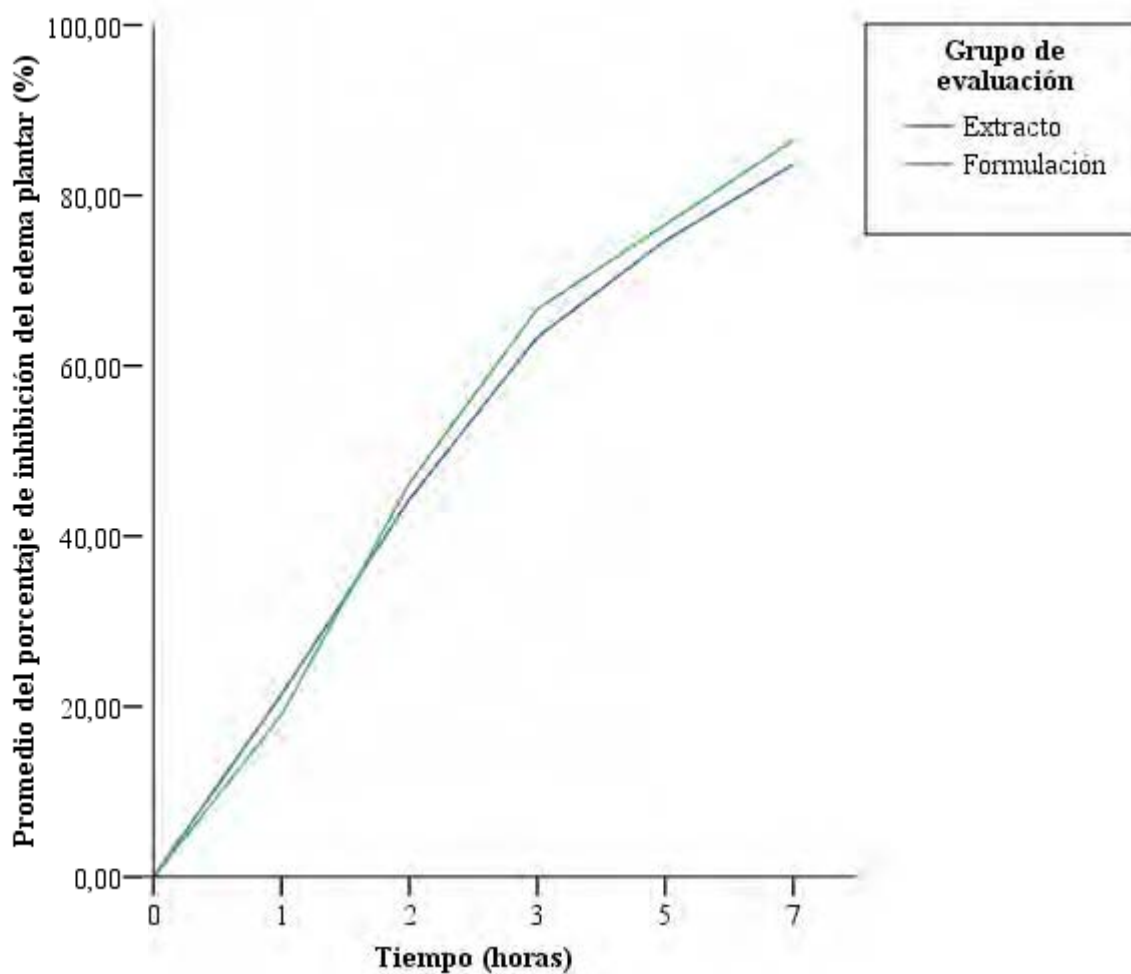


Grafico 4. Promedio del porcentaje de inhibición de edema plantar del extracto de *B. latifolia* vs. la formulación de crema-gel de *B. latifolia* en el tiempo

4.2.5.2 Análisis estadístico de la comprobación del efecto antiinflamatorio de la formulación de crema-gel de *B. latifolia* y del extracto de *B. latifolia* a las 5 horas.

Tabla 13. Descriptivos de la inhibición del edema plantar a las 5 horas

Variable	Grupo de evaluación	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Inhibición de edema plantar	Extracto	6	0,03500	0,005477	0,002236
	Fórmula	6	0,02500	0,005477	0,002236

Tabla 14. Prueba de Levene y Prueba de t-Student de muestras independientes a las 5 horas

Prueba de Levene		Prueba t-Student para la igualdad de medias				
F	Sig.	*Texp	*gl	Media cuadrática	*p	*Tteo
$2,89 \times 10^{-14}$	1,00	3,162	10	0,010000	<0,05	1,812

*gl = grados de libertad / *Texp = valor experimental / *p = grado de significancia / *Tteo= valor teórico

Prueba de Levene:

De este análisis resulta que la significancia obtenida (1,00) es mayor a 0,05 por lo que se acepta la igualdad de las varianzas lo que indica que las poblaciones evaluadas tienen una distribución normal y varianzas homogéneas; por tanto para determinar las diferencias significativas entre los grupos extracto y formulación se aplica la prueba T-Student.

Prueba T-Student:

H0: No existe diferencia entre las medias

H1: Existe diferencia entre las medias

Si el valor Texp se encuentra fuera del rango de -1,812 a + 1,812, la hipótesis nula se rechaza. Como se observa en el análisis valor obtenido para Texp = 3,162 se encuentra fuera del rango establecido, se rechaza la H0 por tanto existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos estudiados.

V. DISCUSIÓN

La especie *Baccharis latifolia* “chilco ha sido empleada en la medicina tradicional por su efecto antiinflamatorio (Hodson, 1970; Roersch, 1994; Astudillo, 2003), el mismo que ha sido corroborado posteriormente por varios estudios farmacológicos.

En uno de estos estudios, el realizado por Abad *et al* en el 2006, se evaluó la actividad antiinflamatoria en cultivos celulares empleando los extractos hexánico, diclorometánico, etanólico y acuoso de las hojas de *Baccharis latifolia*, obteniéndose que los extractos etanólico y acuoso presentaban una acción inhibidora preferencial en la vía iniciada por la enzima 5-lipooxigenasa (responsable de la producción de leucotrienos), y también una alta selectividad en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, siendo la inhibición en la enzima ciclooxigenasa – 2 (responsable de la formación de prostaglandinas en lugares inflamados) superior al de enzima ciclooxigenasa – 1 (responsable de la formación de prostaglandinas implicadas en la homeostasis general), desprendiéndose así la importancia del efecto antiinflamatorio de estos extractos; por otro lado, el extracto acuoso también presentó una importante actividad inhibitoria en la formación de óxido nítrico (mediador del proceso de inflamación), corroborando así los resultados reportados por Pérez-García *et al* en el 2001 quienes señalaron que el extracto de la especie *Baccharis latifolia* inhibía la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) demostrando así su actividad antioxidante relacionado con su efecto antiinflamatorio. Por otro lado, en un estudio realizado por Beltran *et al* en el 2006 evaluaron nuevamente el efecto antiinflamatorio de diferentes extractos de *B. latifolia in vivo* siguiendo el método del edema plantar inducido por carragenina en ratones, obteniendo un mayor efecto antiinflamatorio en el extracto etanólico en comparación a los demás extractos (el porcentaje de inhibición de la inflamación del extracto etanólico administrado por vía oral en una dosis de 100mg/kg fue 63,72%). En base a los resultados obtenidos en estos estudios previos se puede observar que tanto el extracto acuoso como etanólico presentan un importante efecto antiinflamatorio, y según la referencia consultada (Voigt, 1982) con una mezcla

hidroalcohólica al 70% v/v se logra un óptimo rendimiento en la extracción de sustancias que estarían involucradas en este caso con el efecto antiinflamatorio, es por ello que para el desarrollo del activo (extracto de *Baccharis latifolia*) en este trabajo se decidió utilizar la mezcla hidroalcohólica al 70% v/v. La elección del solvente de extracción empleado también estuvo justificada por la composición fitoquímica de la planta (García-Barriga, 1992; Gupta, 1995; Beltran, 2006 Astudillo, 2003), que consiste principalmente de flavonoides, alcaloides y compuestos triterpénicos y/o esteroídicos; debido a que los flavonoides (Kukliski, 2000) en su forma de aglicón son solubles en medios orgánicos como etanol y metanol, mientras que como heterósidos tienen mayor solubilidad en agua y mezclas hidroalcohólicas; así como los alcaloides (Domínguez, 1979; Look, 1988) en su forma libre presentan mayor solubilidad en disolventes orgánicos mientras que como sales son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas; y, en el caso de compuestos triterpénicos y esteroídicos (Kukliski, 2000; Domínguez, 1979; Look, 1988) se observa el mismo comportamiento en la solubilidad de los compuestos de acuerdo a si se encuentran libres (solubilidad en solventes orgánicos) o unidos a un azúcar (solubilidad en agua y mezclas hidroalcohólicas).

Cuando se obtuvo el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* éste fue concentrado hasta obtener un extracto seco, el mismo que fue sometido a un análisis fisicoquímico, el cual consistió en una prueba de solubilidad, una marcha fitoquímica y una identificación cromatográfica, estas pruebas nos sirvieron para obtener información primaria para la identificación del extracto como activo, y para la elaboración de especificaciones que permitieron la confección de un protocolo analítico para su posterior identificación.

Los resultados de la prueba de solubilidad (Cuadro 1, Foto 5) comprobaron la naturaleza polar de los componentes presentes en el extracto, siendo la solubilidad del extracto superior en agua y etanol, y por el contrario mínima en n-butanol, acetona y éter de petróleo.

En la marcha fitoquímica (Cuadro 2, Fotos 6 al 19) se comprobó la presencia de compuestos fenólicos, taninos (taninos catéquicos), compuestos triterpénicos y/o esteroídicos, flavonoides,

alcaloides y leucoantocinidinas, que también fueron identificados en estudios previos (García-Barriga, 1992; Gupta, 1995; Beltran, 2006; Astudillo, 2003), sin embargo no fue detectada la presencia de quinonas como ha sido descrito anteriormente (Beltran, 2006) pudiendo deberse a una variación en la composición fitoquímica debido a la diferente procedencia de la planta (Amazonas en nuestro estudio y Ayacucho en el estudio de referencia).

Adicionalmente a lo realizado en estudios anteriores, en nuestro estudio también se procedió a la identificación cromatográfica de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos, flavonoides y alcaloides por ser compuestos que pueden estar involucrados con el efecto antiinflamatorio del extracto y cuya presencia fue detectada en la marcha fitoquímica, asimismo la presencia de estos compuestos y sus respectivos coeficientes de retención (Rf) procedentes de la identificación cromatográfica nos sirven como marcadores para la posterior comprobación de la presencia del extracto en una forma farmacéutica.

En primer lugar, en la identificación cromatográfica de los compuestos triterpénicos y/o esteroídicos (Cuadro 3, Fotos 20 a 25) se comprobó que el sistema de solventes (benceno: acetato de etilo) recomendado para este tipo de compuestos (Look, 1988) es efectivo en la separación de los mismos, evidenciándose esta separación con el uso de reveladores recomendados para los mismos. En tanto que para la identificación cromatográfica de los flavonoides presentes en el extracto se logró una separación óptima de compuestos utilizando un sistema de solventes de elevada polaridad como es Forestal (agua: ácido acético: ácido clorhídrico) (Cuadro 5, Foto 26), lo que nos indica que la mayor parte de los flavonoides presentes en el extracto estarían fuertemente hidroxilados y por consiguiente poseerían una elevada polaridad, polaridad comprobada además con el empleo de sistemas de solventes de menor polaridad (CHCl_3 : Metanol) en los cuales no se evidenció una separación efectiva de los compuestos presentes en el extracto (Cuadro 4).

Para la identificación cromatográfica de los alcaloides existentes en el extracto, se siguió un tratamiento general para pasar los alcaloides en forma de sal a su forma base (Domínguez, 1979;

Look, 1988), y utilizando el sistema de solventes metanol: amoníaco se obtuvo una separación óptima de estas bases procedentes de las respectivas sales de alcaloides (Cuadro 7, Fotos 27 a 29).

Luego de realizar la evaluación fisicoquímica del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* se prosiguió con la corroboración del efecto antiinflamatorio, y para ello se empleó el método del edema plantar inducido por carragenina en ratones (Winter, 1962; Sugishita, 1981) al realizar las mediciones en la inhibición del edema (Tabla 3, Fotos 30 a 36) se comprobó que el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* posee un buen efecto antiinflamatorio tal como fue reportado en estudios anteriores con los extractos etanólico y acuoso (Beltran, 2006; Abad, 2006) .

De acuerdo al método empleado se tiene que el mayor efecto de la carragenina (agente flogístico) según referencia (Winter, 1962) se obtiene entre las 3 – 5 horas de ser administrada, siendo en nuestro estudio comprobado a partir de las 5 horas, por la observación de la tendencia a la baja de la meseta formada (Gráfico 1). Del análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio en diferentes concentraciones del extracto y un grupo control, a las 5 horas de administrada la carragenina (Tabla 4) se demuestra que existe una diferencia significativa en los resultados obtenidos para los diferentes grupos (Tabla 5 y 6), evidenciándose de esta manera que existe un efecto antiinflamatorio en los grupos que recibieron el extracto respecto al control. Al evaluar las diferencias existentes en el efecto producido por cada uno de los grupos en relación a los demás (Tabla 7 y 8), se comprobó que el grupo control y la concentración de 1,25 mg/0,1g presentaron diferencias significativas respecto a los grupos restantes, esto nos puede indicar que si bien la concentración del 1,25 mg/0,1g presenta un efecto antiinflamatorio, este efecto no es comparable al de las concentraciones superiores. Asimismo se observó que a partir de la concentración de 2,5mg/0,1g el efecto antiinflamatorio no presentó una diferencia significativa en relación a las concentraciones superiores, excepto con la concentración de 7mg/0,1g, donde esta diferencia significativa es justificada porque las concentraciones 2,5mg/0,1g y 7mg/0,1g son extremas, sin embargo el efecto de ambas no presentó una diferencia significativa con las

concentraciones intermedias (3,75mg/0,1g y 5mg/0,1g), lo que puede indicar que el efecto de la concentración de 2,5mg/0,1g y 7mg/0,1g no son realmente diferentes.

Posteriormente, se determinó el porcentaje de inhibición del edema plantar (Tabla 9 y 10) y mediante la elaboración de la recta de regresión lineal a partir de los valores del porcentaje de inhibición a las 5 horas se determinó que la dosis efectiva media (DE50) fue 1,086 mg (Gráfico 2).

De acuerdo a la evaluación farmacológica se eligió la concentración de 2,5mg/0,1g como la mínima concentración que mantenía un considerable efecto antiinflamatorio y no presentaba una diferencia significativa real en el efecto al ser comparada con dosis superiores.

A partir de la concentración de 2,5mg/0,1g, se determinó cuál sería la concentración del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* a emplear en la elaboración de la forma farmacéutica tópica (Cuadro 8). Para esto se consideró que el extracto obtenido debía favorecer la posterior incorporación en una forma farmacéutica y a su vez garantizar que los activos presentes en el extracto se mantuvieran en solución y no precipitaran, esto se consiguió con las concentraciones de 6,25% y 5%, que permitía que el extracto constituya el 40% y 50% del producto terminado respectivamente, se eligió la concentración de 6,25% porque nos permitía utilizar una mayor proporción de los excipientes necesarios en la formulación (en un 60%) al utilizar un extracto de mayor concentración. Al emplear el extracto hidroalcohólico a una concentración de 6,25% en el 40% en la formulación, obtuvimos en el producto terminado una concentración final de 2,5% de extracto seco de *B. latifolia*, que fue la concentración elegida en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio. Cuando se estableció la concentración requerida en el extracto para la elaboración del producto terminado (extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* al 6,25%), este extracto fue analizado de acuerdo a las especificaciones establecidas en el análisis del extracto seco de *Baccharis latifolia*, siendo los resultado conformes (Diagrama 5; Cuadro 9; Foto 37).

Una vez obtenido el activo (extracto hidroalcohólico de *B. latifolia* al 6,25%) se procedió a evaluar las características de diferentes formas farmacéuticas de uso tópico que podrían utilizarse, tomando en consideración entre otros aspectos la factibilidad de su fabricación, aspecto, estabilidad y costos

(Cuadro 10), de esta evaluación se descartaron las formas farmacéuticas pasta, base hidrocarbonada y crema A/O por no permitir una elevada incorporación de líquidos hidrofílicos y en especial aquellos de naturaleza hidroalcohólica como el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, que debía constituir el 40% de la fórmula para alcanzar la dosis elegida en la evaluación farmacológica. Asimismo, estas formas farmacéuticas al ser de naturaleza oclusiva no favorecerían el alivio del tipo de inflamación a la que es destinada la formulación, es decir para afecciones como la inflamación aguda donde se requiere un efecto refrescante, que se produce con la evaporación del agua contenida en la formulación (Voigt, 1982), que sirve para aliviar la sensación de quemazón local producida en la inflamación. Luego se corroboró experimentalmente la factibilidad de uso del extracto en las formas farmacéuticas gel, crema O/A y crema-gel (Formulaciones 1 a 8), empleando los excipientes seleccionados según la características que otorgan a la formulación, su estabilidad, concentración de uso y costo (Cuadro 11 a 14); se comprobó que el uso del extracto en la forma farmacéutica crema-gel lograba mejores resultados en cuanto a la estabilidad inmediata de la fórmula a comparación de las otras formas farmacéuticas (con la formas farmacéutica crema O/A no se formó la emulsión, mientras que con el gel se formó un exudado), asimismo recogía las ventajas de estas formas farmacéuticas: con la fase oleosa se forma una fase continua con la piel (de naturaleza lipídica) facilitando el ingreso de los compuestos presentes en el extracto y a su vez la fase acuosa gelificada proporciona una mayor estabilidad a los glóbulos de grasa en suspensión. Luego de elegir la forma farmacéutica crema-gel se hicieron evaluaciones con otros excipientes (Formulaciones 9 a 20) para mejorar el aspecto y estabilidad del producto final, por esta razón se empleó alcohol cetílico como emulsificante pero su incorporación en la formulación impedía la formación de una emulsión debido a incompatibilidades con otros componentes de la misma (incompatible con aniones) (Lund, 1994), también se evaluó el uso de la cera lanette en la formulación pero fue incompatible con los otros componentes de la formulación, por tanto se volvió a la fórmula original de crema-gel haciendo modificaciones en el tipo de humectante empleado, ya que con el uso de glicerina en lugar de propilenglicol se reducía la irritación que pudiera causar el

segundo y además se lograba garantizar la estabilidad con el resto de componentes de la formulación.

Después de definir la fórmula del producto terminado con la formulación 20 (Diagrama 6) se procedió al análisis fisicoquímico del producto terminado (análisis físico e identificación cromatográfica), los resultados de estas pruebas nos permitieron establecer las especificaciones del producto terminado que podrían ser utilizadas en el control de calidad en posteriores fabricaciones. Asimismo, para el envasado del producto terminado se eligió como envase primario el tubo de aluminio colapsible frente a otros materiales presentes en el mercado por su mayor disponibilidad y mejor costo, y en especial porque al ser utilizado por el paciente no permite la incorporación de aire en su interior el que puede ir acompañado de microorganismos contaminantes que reducirían el periodo de uso del producto terminado. (Cuadro 15 a 17, Fotos 38 a 41).

El resultado de la prueba de pH obtenido en la evaluación física fue conforme a lo esperado para una forma farmacéutica de uso tópico, ya que este debe ser neutro o débilmente ácido (Trillo, 1993). Luego, para comprobar la presencia del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* en el producto terminado sólo se requería identificar uno de los compuestos presentes que nos sirviera de marcador, por esta razón se eligió los compuestos triterpénicos y/o esteroídicos porque habían sido identificados cromatográficamente en el extracto y además la técnica empleada en la identificación presentaba menor interferencia (se somete a digestión la totalidad de la muestra a evaluar sin requerir de alguna extracción previa) en comparación a la empleada con los compuestos flavonoides (interferencia porque requiere una extracción con solventes polares los mismos que son miscibles con la formulación y por tanto no se separan para formar dos fases), y alcaloides (interferencia porque requiere la eliminación de los componentes oleosos de la formulación, los mismos que podrían solubilizar las bases de alcaloides presentes en el extracto). En la evaluación por CCF se empleó como estándar el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, un placebo de la formulación y la formulación en sí; todas las muestras se sometieron a las mismas condiciones, comprobándose por CCF que tanto el estándar como la formulación presentaron una reacción

positiva con el uso de reveladores que evidenciaron la presencia de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos, no observándose dicha respuesta positiva en el placebo de la formulación (Cuadro 16, Foto 42 a 44). Según los resultados obtenidos en esta evaluación se demuestra la presencia del extracto de *B. latifolia* en la formulación y la utilidad del método empleado en la identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos (Cuadro 17).

Finalmente , se comprobó el efecto antiinflamatorio en el producto final empleando el método del edema plantar inducido por carragenina en ratones (Winter, 1962; Sugishita, 1981) al realizar las mediciones en la inhibición del edema (Tabla 11 y 12, Foto 45, Gráfico 3 y 4) en el grupo que recibió la formulación y el grupo que recibió sólo el extracto, usando como controles los grupos que recibieron sólo los vehículos, demostrando que la formulación presenta el efecto antiinflamatorio observado en el extracto, mientras que no sucede lo mismo con los placebos. De ese modo se pudo evidenciar que la formulación sigue manteniendo el efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*. En el análisis estadístico empleado para comparar los resultados obtenidos en el extracto y la formulación se utilizaron los valores registrados a las 5 horas de administrada la carragenina (Tabla 13) tal como se procedió en la corroboración del efecto antiinflamatorio del extracto. Se comprobó que existe una diferencia significativa en el efecto antiinflamatorio de ambos grupos (Tabla 14), siendo el efecto de la formulación mayor al obtenido en el extracto, esto se puede justificar porque al ser administrado el extracto a través de la forma farmacéutica crema-gel se logra una mejor absorción de los compuestos presentes en el extracto.

VI. CONCLUSIONES

1. La forma farmacéutica crema-gel diseñada, de aplicación tópica con efecto antiinflamatorio, incorpora satisfactoriamente como activo al extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*.
2. La forma farmacéutica diseñada como crema-gel conteniendo el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 2,5%, presenta un efecto antiinflamatorio mayor al efecto observado en el extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* solo.
3. La presencia de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos, flavonoides y alcaloides constituyen los marcadores para la identificación del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia*, mientras que la presencia de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos constituyen los marcadores de identificación del extracto de *Baccharis latifolia* en el producto terminado.

RECOMENDACIONES

1. Establecer el perfil quimiotaxonómico de la muestra de *Baccharis latifolia* utilizada en el presente trabajo de investigación.
2. Continuar con el análisis fitoquímico para determinar la estructura de los activos responsables de la actividad antiinflamatoria del extracto.
3. Realizar estudios de estabilidad acelerada del producto en tubos de aluminio colapsible como envase inmediato según las condiciones sugeridas en el Anexo.
4. Emplear la formulación diseñada en estudios clínicos posteriores para determinar su utilidad en el tratamiento de la inflamación aguda.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) García H. Flora medicinal de Colombia: Botánica Médica. Segunda edición. Tercer mundo editores. Bogotá: 1992.
- (2) Reynel C, León J. Árboles y arbustos andinos para agroforestería y conservación de suelos. Proyecto FAO Holanda- DGFF. Tomo II. 1990.
- (3) Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro de estudios regionales andinos "Bartolomé de las Casas". Cusco: 1999.
- (4) Rutter R. Catálogo de plantas útiles de la amazonía peruana. Segunda edición revisada. Instituto lingüístico de verano. Pucallpa: 1990.
- (5) Roersch C. Plantas medicinales en el sur andino del Perú. Koeltz Scientific Books. Königstein: 1994.
- (6) <http://www.hear.org/gcw/html/autogend/species/2459.HTM>. Global Compendium of Weeds. (Recuperado 10.10.2005)
- (7) Guerra D. Tesis de aptitud profesional. Aislamiento y elucidación estructural de flavonoides de *Baccharis genistelloides* Pers "Tres filos" "Kinsa kuchu". UNMSM. Lima: 1995.
- (8) Ariza L. Las especies *Baccharis* (Compositae) de Argentina central. Trabajos del Museo Botánico. Tomo III N° 4. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba: 1974.
- (9) Verdi L, Brighente I, Pizzolatti M. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. Quím. Nova [online]. 2005, vol. 28, no. 1 [cited 2008-01-02], pp. 85-94. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100017&lng=en&nrm=iso. ISSN 0100-4042. doi: 10.1590/S0100-40422005000100017
- (10) Editor. Hodson E, García H, Idrobo J, et. al. Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Secretaria ejecutiva del convenio Andrés Bello. Tomo V. 1988.
- (11) Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Editorial Salesiana. Lima: 1970.

- (12) <http://200.14.206.180/publnw/res/4.htm> Protocolo distrital de restauración ecológica: Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente (Recuperado 10.10.2005)
- (13) Gupta M. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. CYTED. Primera edición. Editorial Presencia Ltda. Colombia (Bogotá): 1995
- (14) Astudillo A. Fitoterápicos antibacterianos y antifúngicos. Revista de la Facultad de Ciencias Químicas /Facultad de Ciencias Químicas. Nº 2. 2003. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- (15) Peña J. Inmunologiaonline. Universidad de Córdoba y Sweden Diagnostics (Spain). Celada A. Inflamación. Capítulo 25. Disponible en:
<http://www.inmunologiaonline.com/inmunologia/tema25/etexto25.htm> (Recuperado 02.01.2008)
- (16) <http://www.caninum.com/atlas/inflamacion/tiposdeinflamacion.htm> (Recuperado 29.05.2008)
- (17) Flórez J; Armijo J; Mediavilla A. Farmacología humana. Tercera edición. Masson. Barcelona: 2000.
- (18) Contreras F; Blanco M. Fisiopatología. Primera edición. McGraw-Hill Interamericana. Caracas: 1997.
- (19) Abad M; Bessa A; et al. Anti-inflammatory activity of 4 Bolivian Baccharis species (Compositae). Journal of Ethnopharmacology 103 (2006) 338 - 344.
- (20) Beltran C; Janampa A; Sánchez B. Tesis de aptitud profesional. Determinación de la actividad antiinflamatoria del Baccharis latifolia R&P (Chilco). UNSLG. Ica: 2006.
- (21) Perez-García F; Marín E. Activity of plants extracts in the respiratory Bursa and the stress protein synthesis. Journal of Phytomedicine. Vol 8 (Nº 1) 31-38.
- (22) Kukliski C. Farmacognosia: Estudios de las Drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona: 2000
- (23) Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales: Editorial Acribia. Zaragoza: 2001.
- (24) Robak J; Gryglewski R. Bioactivity of flavonoids. Pol J Pharmacol. 1996. 48 (6) 555 – 564.

- (25) Kim H; Son K; Chang H; Kang S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004. 96 (3) 229 – 245.
- (26) Domínguez; Xorge. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México DF: 1979
- (27) Look O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Perú: 1988
- (28) Voigt R; Bornschein M. Tratado de tecnología farmacéutica. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza: 1982.
- (29) The United States Pharmacopeia 30th Ed y the National Formulary 25th Ed. Trigésimo primera edición, vigésimo sexta edición. 2006 US Pharmacopoeia Convention. Port City Press. Baltimore: 2006.
- (30) Trillo F. Tratado de farmacia galénica. Primera edición. Luzan 5, S.A Ediciones. Madrid: 1993.
- (31) Aulton ME. Pharmaceutics: the science of dosage forms. Segunda edición. Churchill Livingstone. Edinburgo: 2002
- (32) Lund W. Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics. Duodécima Edición. Pharmaceutical Pr. Londres: 1994.
- (33) Sánchez C. Manual de técnicas de investigación. CYTED. Bogotá: 1995.
- (34) Sugishita E; Amaya S; Ogihara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J. Pharm. Dyn.* Vol 4 (Nº8) 565 – 575 (1981)
- (35) Winter C; Risley E; Nuss G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol.Med.* **111**:544-7, 1962. [Merck Institute for Therapeutic Research, West Point, PA]
- (36) Kibbe A (editor); Wade A; Weller P. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Tercera edición. Amer Pharmaceutical Assn. Londres: 2000

IX. ANEXOS



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 147-USM-2005

LA JEFA(e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra botánica (planta completa) recibida de Srta. **KELLY MELISSA HOYOS VARGAS**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Baccharis latifolia* (R & P) Persoon** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: *Baccharis*

ESPECIE: *Baccharis latifolia* (R & P)
Persoon

Nombre vulgar: "Chilco", Dpto. Amazonas, prov. Rodríguez de Mendoza.
Determinada por: **Dra. Enma Cerrate**.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 25 de Noviembre 2005.



Joaculpa Albán C.

Mn. Joaculpa Albán C.

**JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS
(USM)**

DDB.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N°

143-2007

Producto : Ratón albino
Especie : Mus musculus
Cepa : Balb/c/CNPB
Peso : 25 – 30 gr.

Lote N° : M – 37 - 2007
Cantidad : 48
Edad : 1 mes y ½
Sexo : Hembras

Boleta de : 09772 GR: 015932
venta N°
Fecha : 13 - 09 -07

Destino : MELISSA HOYOS VARGAS.

El Médico Veterinario, que suscribe, Jorge Ruiz Alarcón. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 13 de Setiembre del 2007

NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.

M.V. Jorge Ruiz Alarcón.
C.M.V.P. 5052



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N°

073-2008

Producto : Ratón albino
Especie : Mus musculus
Cepa : Balb/c/CNPB
Peso : Mayor a 25 gr.

Lote N° : M-14-2008
Cantidad : 25
Edad : 2 meses
Sexo : Hembras

Boleta de : 004-010368
Venta N°
Fecha : 04-04-08

Destino : Melissa Hoyos Vargas
U.N.M.S.M.

El Médico Veterinario, que suscribe, JORGE RUIZ ALARCÓN. Coordinador de Bioterio
Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas
condiciones sanitarias *.

*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, cuarentena y control
sanitario para animales de experimentación.

Chorrillos, 04 de Abril del 2008

NOTA : El bioterio no se hace
responsable por el estado de
los animales, una vez que
éstos egresan del mismo.


Jorge Ruiz Alarcón. M.V.
C.M.V.P. 5052

1. PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Foto 5. Prueba de solubilidad del extracto seco de *B. latifolia*

2. MARCHA FITOQUÍMICA

Fracción A

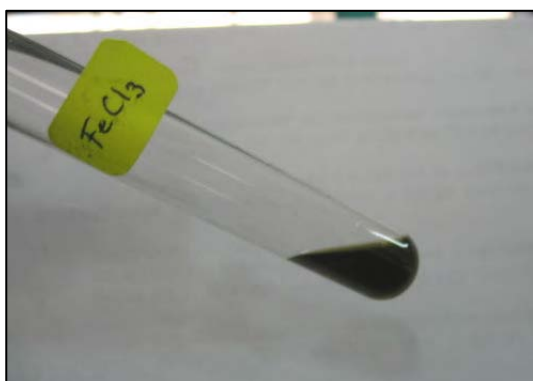


Foto 6: Identificación de taninos con FeCl_3



Foto 7: Identificación de taninos con agua de bromo

Fracción A



Foto 8: Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroídicos



Foto 9: Identificación de flavonoides

Fracción A



Foto 10: Identificación de aminoácidos

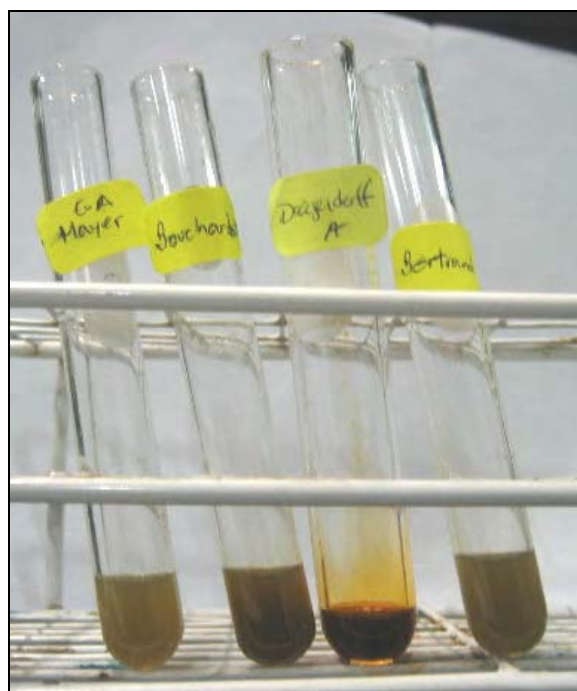


Foto 11: Identificación de alcaloides

Fracción B

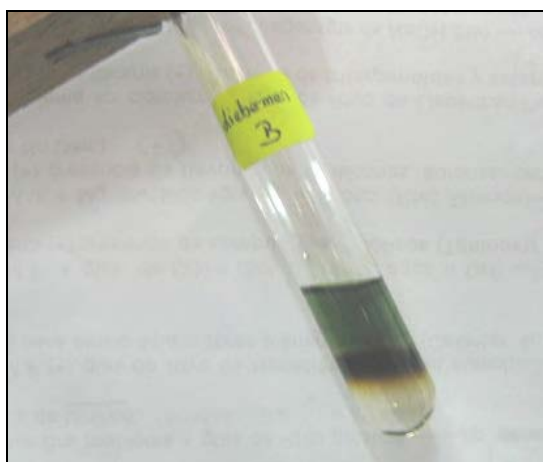


Foto 12: Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos

Fracción C1



Foto 13: Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos

Fracción D1



Foto 14: Identificación de flavonoides

Fracción D2



Foto 15: Identificación de leucoantocianidinas

Fracción D4



Foto 16: Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos

Fracción D5

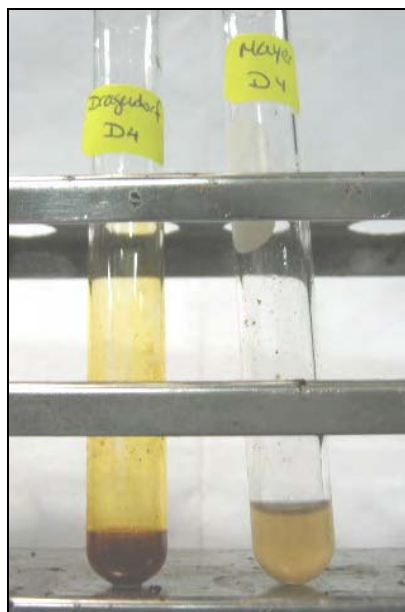


Foto 17: Identificación de alcaloides

Fracción E



Foto 18: Identificación de leucoantocianidinas

Fracción E



Foto 19: Identificación de flavonoides

3. IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos – Placa 1



Foto 20: Recorrido con sistema de solventes



Foto 21: Placa después de uso de reveladores

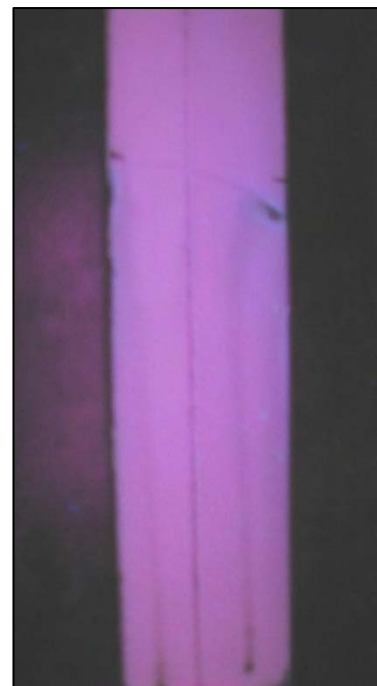


Foto 22: Placa después de uso de reveladores + luz UV

Identificación de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos – Placa 2

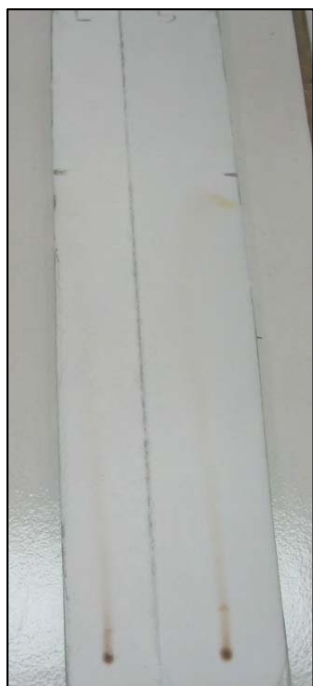


Foto 23: Recorrido con sistema de solventes



Foto 24: Placa después de uso de reveladores

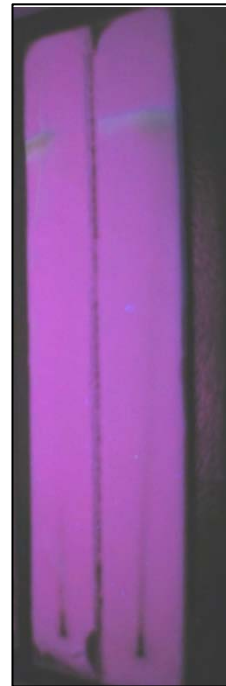


Foto 25: Placa después de uso de reveladores + luz UV

Identificación de Flavonoides



Foto 26: Placa después del uso de reveladores

Identificación de Alcaloides – Placa 1



Foto 27: Placa después del uso de reveladores

Identificación de Alcaloides – Placa 2

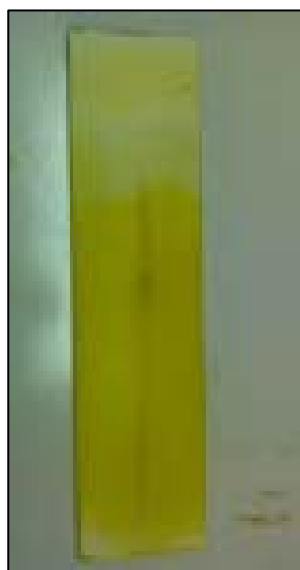


Foto 28: Placa después del uso de reveladores

Identificación de Alcaloides – Placa 3



Foto 29: Placa después del uso de reveladores

4. CORROBORACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN EL EXTRACTO SECO DE *Baccharis latifolia*

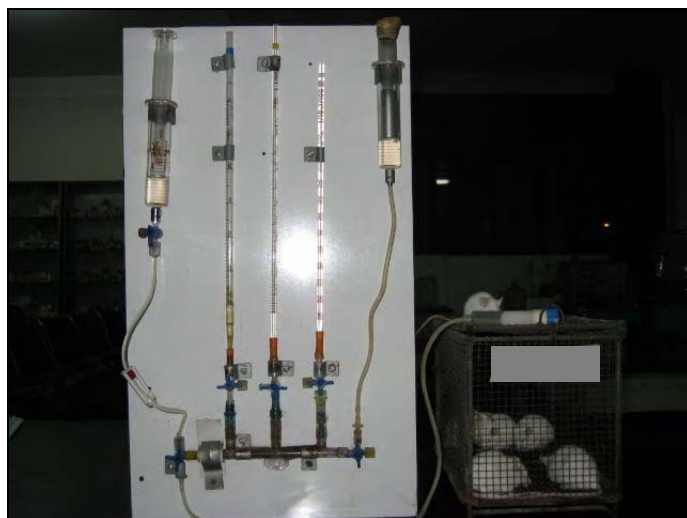


Foto 30: Equipo - Pletismómetro Manual



Foto 31: Grupo Control



Foto 32: Grupo D1



Foto 33: Grupo D2



Foto 34: Grupo D3



Foto 35: Grupo D4



Foto 36: Grupo D5

5. ANALISIS FISICOQUIMICO DEL ACTIVO



Foto 37. Extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* al 6,25%

6. DISEÑO DE LA FORMULACIÓN

Formulación 20: Crema-Gel de *Baccharis latifolia* al 2,5%



Foto 38. Crema- gel en granel



Foto 39. Crema-gel en granel



Foto 40. Crema-gel en envase inmediato



Foto 41. Crema- gel en envase inmediato

7. ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO

Identificación cromatográfica de compuestos triterpénicos y/o esteroidicos

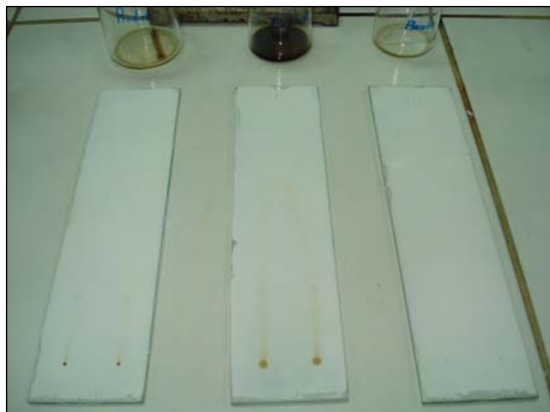
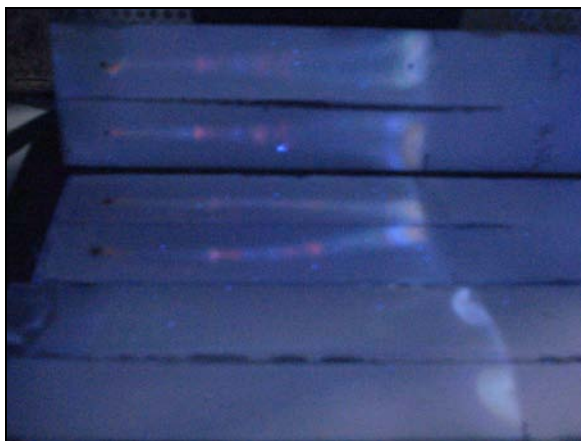


Foto 42. Recorrido con sistema de solventes



Foto 43: Placas después de uso de reveladores



**Foto 44: Placas después del uso de reveladores
+ luz UV**

7. COMPROBACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN EL PRODUCTO TERMINADO



**Foto 45. Aplicación del producto terminado en el animal
de experimentación**

Tabla. 15. Valores del volumen del edema plantar obtenido en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio en las concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* en el tiempo (mL)

Tiempo	Número de animal	Control	D 1	D 2	D 3	D4	D5
1 hora	1	0,17	0,13	0,13	0,10	0,11	0,13
	2	0,09	0,10	0,03	0,11	0,05	0,07
	3	0,17	0,11	0,08	0,07	0,12	0,12
	4	0,13	0,10	0,08	0,13		0,09
	5	0,12	0,10	0,11	0,06	0,10	0,06
	6	0,16	0,10	0,13	0,09	0,08	0,04
2 hora	1	0,18	0,12	0,10	0,11	0,11	0,09
	2	0,13	0,13	0,01	0,07	0,03	0,01
	3	0,28	0,13	0,12	0,07	0,09	0,04
	4	0,15	0,12	0,06	0,12		0,06
	5	0,16	0,12	0,09	0,05	0,07	0,04
	6	0,16	0,12	0,11	0,06	0,05	0,02
3 hora	1	0,18	0,10	0,02	0,07	0,04	0,07
	2	0,12	0,10	0,03	0,06	0,01	0,02
	3	0,14	0,11	0,07	0,03	0,06	0,03
	4	0,20	0,10	0,04	0,04		0,02
	5	0,16	0,10	0,06	0,04	0,06	0,03
	6	0,16	0,10	0,04	0,04	0,03	0,01
5 hora	1	0,15	0,05	0,03	0,02	0,02	0,00
	2	0,14	0,08	0,02	0,01	0,00	0,00
	3	0,14	0,07	0,04	0,04	0,04	0,00
	4	0,15	0,09	0,03	0,03		0,02
	5	0,15	0,08	0,04	0,03	0,03	0,01
	6	0,15	0,08	0,03	0,00	0,01	0,01
7 hora	1	0,03					
	2	0,09					
	3	0,14					
	4	0,08					
	5	0,09					
	6	0,00					

Tabla. 16. Valores del porcentaje de inhibición del edema plantar obtenido en la prueba de corroboración del efecto antiinflamatorio en las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Baccharis latifolia* en el tiempo (mL)

Tiempo	Número de animal	D 1	D 2	D 3	D4	D5
1 hora	1	7,14	7,14	28,57	21,43	7,14
	2	28,57	78,57	21,43	64,29	50,00
	3	21,43	42,86	50,00	14,29	14,29
	4	28,57	42,86	7,14		35,71
	5	28,57	21,43	57,14	28,57	57,14
	6	28,57	7,14	35,71	42,86	71,43
2 hora	1	32,08	43,40	37,74	37,74	49,06
	2	26,42	94,34	60,38	83,02	94,34
	3	26,42	32,08	60,38	49,06	77,36
	4	32,08	66,04	32,08		66,04
	5	32,08	49,06	71,70	60,38	77,36
	6	32,08	37,74	66,04	71,70	88,68
3 hora	1	37,50	87,50	56,25	75,00	56,25
	2	37,50	81,25	62,50	93,75	87,50
	3	31,25	56,25	81,25	62,50	81,25
	4	37,50	75,00	75,00		87,50
	5	37,50	62,50	75,00	62,50	81,25
	6	37,50	75,00	75,00	81,25	93,75
5 hora	1	65,91	79,55	86,36	86,36	100,00
	2	45,45	86,36	93,18	100,00	100,00
	3	52,27	72,73	72,73	72,73	100,00
	4	38,64	79,55	79,55		86,36
	5	45,45	72,73	79,55	79,55	93,18
	6	45,45	79,55	100,00	93,18	93,18

Tabla. 17. Valores del volumen del edema plantar obtenido en la prueba de comprobación del efecto antiinflamatorio en los grupos evaluados en el tiempo (mL)

Tiempo	Número de animal	Placebo de extracto	Extracto	Placebo de formulación	Formulación
1 hora	1	0,14	0,10	0,18	0,11
	2	0,13	0,08	0,17	0,11
	3	0,12	0,10	0,11	0,10
	4	0,10	0,09	0,11	0,11
	5	0,10	0,10	0,11	0,11
	6	0,11	0,08	0,11	0,10
2 horas	1	0,18	0,08	0,21	0,08
	2	0,15	0,07	0,19	0,08
	3	0,16	0,10	0,15	0,08
	4	0,13	0,07	0,15	0,10
	5	0,13	0,09	0,10	0,08
	6	0,13	0,08	0,13	0,08
3 horas	1	0,19	0,07	0,14	0,04
	2	0,16	0,06	0,21	0,05
	3	0,16	0,06	0,20	0,06
	4	0,18	0,05	0,09	0,04
	5	0,16	0,06	0,09	0,05
	6	0,16	0,07	0,11	0,04
5 horas	1	0,11	0,04	0,13	0,02
	2	0,14	0,04	0,11	0,03
	3	0,13	0,04	0,14	0,03
	4	0,14	0,03	0,08	0,02
	5	0,14	0,03	0,08	0,02
	6	0,17	0,03	0,10	0,03
7 horas	1	0,09	0,01	0,07	0,01
	2	0,09	0,01	0,03	0,01
	3	0,06	0,02	0,06	0,01
	4	0,10	0,01	0,05	0,00
	5	0,07	0,02	0,07	0,01
	6	0,14	0,02	0,09	0,01

Tabla. 15. Valores del porcentaje de inhibición del edema plantar obtenido en la prueba de comprobación del efecto antiinflamatorio en los grupos evaluados en el tiempo (%)

Tiempo	Número de animal	Extracto	Formulación
1 hora	1	14,286	16,456
	2	31,429	16,456
	3	14,286	24,051
	4	22,857	16,456
	5	14,286	16,456
	6	31,429	24,051
2 horas	1	45,455	48,387
	2	52,273	48,387
	3	31,818	48,387
	4	52,273	35,484
	5	38,636	48,387
	6	45,455	48,387
3 horas	1	58,416	71,429
	2	64,356	64,286
	3	64,356	57,143
	4	70,297	71,429
	5	64,356	64,286
	6	58,416	71,429
5 horas	1	71,084	81,250
	2	71,084	71,875
	3	71,084	71,875
	4	78,313	81,250
	5	78,313	81,250
	6	78,313	71,875
7 horas	1	89,091	83,784
	2	89,091	83,784
	3	78,182	83,784
	4	89,091	100,000
	5	78,182	83,784
	6	78,182	83,784

CONDICIONES PROPUESTAS PARA UN ESTUDIO DE ESTABILIDAD ACELERADA

Condiciones de almacenamiento	Análisis
30 °C \pm 2 °C, humedad ambiente	Inicial, 90 y 180 días
40 °C \pm 2 °C, humedad ambiente	30, 60, 90 y 180 días

Fecha de fabricación: 03 de abril del 2008